



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Estudio fisicoquímico del represor transcripcional  
NagC de *Escherichia coli***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Bióloga**

**P R E S E N T A:**

**Dana Mariel Díaz Jiménez**



**DIRECTOR DE TESIS:**

**IBB Sergio Zonszein Strauss**

**México, D.F. 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Hoja de datos del jurado

### 1. Datos del alumno

Díaz  
Jiménez  
Dana Mariel  
26376579  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
307007944

### 2. Datos del tutor

Lic.  
Sergio  
Zonszein  
Strauss

### 3. Datos del sinodal 1

Dra.  
Luisa Alvarina  
Alba  
Lois

### 4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Ismael  
Bustos  
Jaimes

### 5. Datos del sinodal 3

Dr.  
Víctor Manuel  
Valdés  
López

### 6. Datos del sinodal 4

Dr.  
Juan Luis  
Chávez  
Pacheco

### 7. Datos del trabajo escrito.

Estudio fisicoquímico del represor transcripcional NagC de *Escherichia coli*  
58p  
2015

## **Agradecimientos**

Este trabajo contó con el apoyo de los proyectos PAPIIT IN213312, PAPIIT IN216615, CONACyT -99857 y CONACyT 116074.

A cada uno de los miembros del jurado quienes aceptaron amablemente revisar este trabajo.

A la Dr. Jacqueline Plumbridge por darnos la cepa utilizada en este trabajo, así como por los comentarios de los resultados obtenidos.

A la M. en C. Laura Iliana Álvarez Añorve, quien me apoyo en la elaboración de los ensayos de entrecruzamiento, así como en el asesoramiento de la sobreexpresión y purificación de la proteína.

A la Dra. Rosario Muñoz Clares y al técnico académico Carlos Mújica por permitirme utilizar y asesorarme en el espectrofluorómetro Shimadzu R F 5000U.

Al Dr. Antonio Peña y a los técnicos académicos Martha Calahorra y Norma Sánchez por permitirme usar y asesorarme en el espectrofluorómetro Olis 071731-SLM8.

A Mariela García brindarme el protocolo del método de tinción de plata.

A Roberto Vázquez por el apoyo brindado para la edición de algunas figuras en la tesis.

A todos los miembros del LFQIP.

Al Dr. Mario Calcagno y Sergio Zonszein por abrirme las puertas al mundo de las proteínas.

## **Dedicatorias**

A Dios.

A mis padres Blanca Jiménez y Jorge Díaz por darme la vida y ser los seres humanos que más pueden amarme y que más puedo amar en este planeta. Por la paciencia y regaños que me han hecho llegar hasta aquí, y me siguen impulsando a continuar en esta profesión.

A mis hermanos Cristina e Iván por ser los mejores amigos que mis padres podrían haberme dado para compartir estos años de vida. Por ser una guía, un ejemplo y un hombro para desahogar mis malos ratos.

A mi abuelo Marcos por no rendirse a pesar de la adversidad y ser la persona más paciente conmigo, por todo el apoyo brindado para continuar mis estudios y por todo el cariño que me das.

A Roberto por enseñarme que la vida es dulce pero también amarga. Por demostrarme que es el amor pero también la decepción. Por enseñarme a vivir la vida con otros ojos, por ser el mejor amigo, compañero. Sobre todo por ser la gran persona y novio que eres y como alguna vez me dijiste: “Aún queda mucho camino por recorrer juntos”.

A Daniela, cero, por ser mi gran amiga.

A mis amigas de la prepa, Yareni, Mafer, Pau, Joce y Damaris.

A Denisse.

A mi “familia” de la facultad: Anabell, Faby, Miguel, Mayra, Fabián, Haydee, Citlalli, Alejandra.

A mis amigos de la facultad: Mariela, Lupita, Edith García, Edith, Nie, Isaí y mi guacamaya!!!

A mi amiga Lore, por las experiencias vividas con las orquídeas!!!

A Marce por las pláticas y el tiempo compartido.

A mis amigos del almacén: Julio, Ricardo y Rodrigo

A mi profesora favorita y por la que estudio biología: María del Refugio Saldaña García.

Al profesor Julio César Tavera Fabela por acercarme al laboratorio e impulsarme a realizar mi primer estancia de investigación.

Al Dr. Pedro Mercado por permitirme trabajar con él en el laboratorio de Fanerogamia, y porque si nunca me hubiera mandado al laboratorio de biología molecular por nitrógeno líquido nunca hubiera nacido en mí tanta curiosidad.

Al Dr. German Bonilla por que su entusiasmo dando clases, fue el origen de mi amor a los procariontes.

Al Laboratorio 226 del IFC, en especial al Dr. Dimitris Georgellis por permitirme explorar el camino de la biología molecular, así como al Dr. Adrian Álvarez por ser un gran maestro para los nuevos alumnos. A los demás miembros y ex miembros del laboratorio: Hoty, Eder, amigueishon, Fany, Clau, Peter.

A Sergio Zonszein, por ser más que mi tutor un amigo, por confiar en mí y darme una oportunidad en un proyecto tan bonito.

Al Dr. Mario Calcagno, por abrirme las puertas del laboratorio, porque me hiciste ver que el éxito profesional no excluye la humildad.

A la M. en C. Laura Álvarez por ser una gran amiga.

A todos los que faltan poner su nombre aquí \_\_\_\_\_.

## Índice.

Abreviaturas .....	7
1.- Resumen .....	8
2.- Introducción.....	9
2.1 Regulación alostérica.....	11
2.2 Cooperatividad y alostería.....	11
2.2.1 La ecuación de Hill .....	12
2.2.2 Ecuación de Adair .....	14
2.2.4 Ecuación de la suma lineal de dos hipérbolas .....	20
2.2.5 Reográfico de Eadie Scatchard .....	21
2.2.6 Reográfico Acerenza-Mizraji.....	22
2.3 Familia ROK.....	24
2.4 NagC .....	24
2.5 Espectroscopía de fluorescencia.....	28
3.- Planteamiento del problema.....	29
4.- Hipótesis.....	30
5.- Objetivo general.....	31
6.- Objetivos particulares .....	31
7.- Materiales y métodos. ....	32
7.1 Cepas.....	32
7.2 Purificación por cromatografía de afinidad por Niquel.....	32
7.3 Purificación por cromatografía de exclusión molecular .....	33
7.4 Concentración de proteína.....	33
7.5 Ensayos de fluorescencia.....	33
7.6 Entrecruzamientos .....	35
8.- Resultados.....	36
8.1 Sobreexpresión, purificación y estabilidad.....	36
8.2 Titulación de NagC con sus diferentes ligantes medidos por fluorescencia. ....	39
8.2.1 Titulación de NagC con las diferentes regiones operadoras.....	40
8.2.2 Titulación de NagC con la molécula inductora.....	46
8.3 Entrecruzamientos .....	49
9.- Discusión .....	50
9.1. Sobreexpresión, purificación y estabilidad.....	50
9.2 Titulación de NagC con sus diferentes ligantes medidos con fluorescencia. ....	50
9.2.1 Titulación de NagC con las diferentes regiones operadoras.....	51
9.2.2 Titulación de NagC con la molécula inductora. ....	53
9.3 Entrecruzamientos .....	53
10.- Conclusiones .....	54
11.- Perspectivas.....	54
12.-Bibliografía .....	56

## Abreviaturas

• GlcNAc6P	<i>N</i> -acetilglucosamina 6-fosfato
• H-T-H	Helix- turn-helix (Hélice-giro-hélice)
• MWC	Monod, Wyman y Changeux
• NaCl	Cloruro de sodio
• NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de sodio monobásico
• PTS	Sistema de fosfotransferasa
• Trp	Triptófano
• Tyr	Tirosina
• CRP	Proteína receptor de catabolito
• IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
• kDa	kiloDalton

## 1.- Resumen

NagC de *Escherichia coli* es el represor transcripcional de los operones divergentes *nagE-nagBACD* entre otros. En su extremo N-terminal tiene un dominio de unión al DNA tipo Hélice-giro-hélice o H-T-H (*Helix-turn-helix*). Se conocen las secuencias de las dos regiones operadoras a las que se une NagC en el operón Nag (operadores *nagE* y *nagB*), sin embargo no se conoce con precisión cuál es la constante de afinidad que NagC tiene por estas secuencias. La afinidad por su molécula inductora, la *N*-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P), tampoco se ha caracterizado directamente. En este trabajo nos enfocamos en conocer las diferentes afinidades que NagC tiene por las secuencias de los dos operadores de los operones divergentes *nagE-nagBACD*, así como por su molécula inductora. También se estudiaron las especies oligoméricas asociadas a la unión de sus ligantes. Se estudió la afinidad de NagC por dos regiones operadoras silvestres, encontrando diferencias en el mecanismo de unión, pero datos similares de las constantes de disociación. También se calculó la afinidad por la región operadora *nagE* super operadora (s.o.). Este operador tiene dentro de su secuencia dos mutaciones puntuales, respecto al operador *nagE* silvestre, en las posiciones -11 y 11 (A por C y T por G respectivamente).

Respecto a la molécula inductora se calculó la afinidad en dos diferentes condiciones; cuando está unida al DNA, NagC tiene una afinidad de 0.65  $\mu\text{M}$  por la GlcNAc6, mientras que cuando no está unida al DNA su afinidad disminuye, mostrando una constante de disociación de 30  $\mu\text{M}$ . No obstante el cambio de afinidad en presencia del DNA, la unión de la GlcNAc6P en ambas condiciones es cooperativa. Este fenómeno sugiere la existencia de distintas especies oligoméricas.

Con base en estas observaciones, se discuten posibles mecanismos para la regulación de la unión de NagC al DNA.

## 2.- Introducción

De los aproximadamente 4000 genes presentes en un genoma bacteriano típico solamente se expresa una fracción en un momento dado. Algunos productos génicos están presentes en cantidades muy grandes: los factores de elongación requeridos para la síntesis proteica, por ejemplo, se encuentran entre las proteínas más abundantes de las bacterias. Otros productos génicos se encuentran en cantidades mucho menores; por ejemplo las enzimas necesarias para reparar lesiones del DNA.

Las necesidades de algunos productos génicos cambian a lo largo del tiempo. Los requerimientos de enzimas en ciertas vías metabólicas pueden aumentar o disminuir en función de los cambios en la disponibilidad de nutrientes.

Dado el elevado costo energético que la síntesis de proteínas significa, la regulación de la expresión génica es esencial para optimizar la energía de la célula.

El primer punto de control de la concentración celular de una proteína está determinada, por la síntesis del transcrito primario (transcripción). El control del inicio de la transcripción permite la regulación de múltiples genes que codifican con actividades interdependientes. Una de las claves de la regulación de la transcripción es la interacción entre proteínas y DNA [1].

Existen genes cuyos productos se requieren en todo momento, a estos genes se les denomina genes constitutivos. Existe un segundo grupo de genes cuya expresión está determinada por la respuesta a señales moleculares, a estos genes se les denomina inducibles.

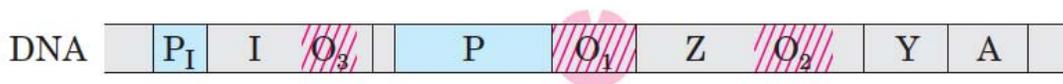
El mecanismo general de las bacterias para coordinar la regulación de los genes que codifican productos implicados en una serie de procesos relacionados es agruparlos en el cromosoma para poder transcribirlos juntos. La mayoría de los mRNA procarióticos son policistronicos, es decir que existen múltiples genes en un solo transcrito y un promotor que inicia la transcripción del grupo de genes. Este grupo de genes, más el promotor y secuencias reguladoras adicionales, como el operador, se denominan operón [1].

El modelo del operón propuesto por Monod y Jacob en 1961 es el primer ejemplo que describe la regulación de la transcripción de genes inducibles en procariontes, como respuesta a los cambios en su medio ambiente [2]. Ellos proponen y demuestran la existencia de la proteína LacI, a la que nombran represor y que forma parte de un sistema

de regulación dependiente de la presencia de lactosa en el medio como fuente principal de carbono.

Este sistema de regulación dependiente de lactosa de *Escherichia coli* consta de dos componentes, los genes estructurales que codifican la enzimas  $\beta$ -galactosidasa (LacZ), la permeasa (LacY) y transacetilasa (LacA), necesarias para el transporte y degradación de lactosa. El segundo componente es el regulatorio que incluye la proteína LacI, el promotor y la región operadora (figura 1).

Todos los componentes excluyendo a LacI forman parte de la región del DNA que Monod y Jacob definieron como operón.



**Figura. 1 Modelo del operón *lac* de *Escherichia coli*. Tomado y modificado de Lehninger [1]. El gen *I* codifica al represor Lac. Los genes *lac Z*, *Y* y *A* codifican la  $\beta$ -galactosidasa, la galactósido permeasa y tiogalactósido transacetilasa, respectivamente. *P* es el promotor para los genes *lac* y *P*<sub>1</sub> es el promotor para el gen *I*. *O*<sub>1</sub> es el operador principal para el operon *lac*; *O*<sub>2</sub> y *O*<sub>3</sub> son los sitios secundarios del operador con menos afinidad por el represor *lac*.**

LacI es una proteína que tiene diferentes sitios de unión a ligantes, el sitio de unión al DNA y el sitio de unión a lactosa. En condiciones donde no hay lactosa permanece unida a la región operadora del operón de lactosa, impidiendo así la transcripción de los genes por la RNA polimerasa. Al unirse una molécula de lactosa esta actúa como efectora de un cambio conformacional provocando una transición en la que se disocia del DNA [3]. A este “switch” genético asociado a los cambios conformacionales de los dos sitios de unión de LacI Jacob y Monod lo llamaron alostería.

La palabra alostería, del griego allos “distinto” y stereos “sólido” fue acuñada por Jaques Monod en el año de 1963 [4]. El término fue utilizado para describir el fenómeno de regulación de las proteínas en donde el ligantes regulador no presentaba una inhibición competitiva clásica.

## **2.1 Regulación alostérica.**

La regulación alostérica es una forma de control en la actividad de distintas vías metabólicas. Como resultado permite definir uno de los principios de la vida, que permite a los organismos vivos adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes. El reconocimiento de este importante papel biológico llevó a la descripción histórica de la alostería como 'el segundo secreto de la vida', sólo después del código genético.

Un fenómeno alostérico es aquel en el que la unión de una molécula reguladora (efector alostérico) en un sitio de la proteína (sitio alostérico), afecta a distancia las propiedades del sitio activo [4].

Este proceso ocurre generalmente a través de un cambio conformacional, que en la mayoría de las ocasiones implica una modificación en el arreglo cuaternario entre las subunidades. El cambio conformacional inducido por el efector o ligante alostérico se conoce como transición alostérica. La alostería en un sentido amplio puede entenderse como el cambio conformacional inducido por la unión de un ligante, que altera las funciones de la proteína en un sitio ligante diferente, y se encuentra presente en una gran diversidad de proteínas, incluyendo proteínas monoméricas [5].

## **2.2 Cooperatividad y alostería.**

La cooperatividad y la alostería son dos fenómenos diferentes aunque existe una estrecha relación entre ellos, sin embargo no todos los fenómenos alostéricos son cooperativos y viceversa.

La cooperatividad se define como un evento propagado entre las subunidades, que cambia la constante de disociación dependiendo del número de subunidades previamente ligadas. La cooperatividad se observa en la unión de un ligante, y también en la cinética de las reacciones de catalizadas por enzimas [6].

La cooperatividad en las proteínas se observa como una desviación de las curvas hiperbólicas, en las curvas de saturación o de velocidad en función de un solo ligante en donde tiende a ser sigmoide.

En ausencia de cooperatividad, la fracción de saturación en función de la concentración de ligante se ajusta al modelo de la isoterma de Langmuir. En el caso de las enzimas este modelo corresponde a la ecuación de Michaelis-Menten.

$$\bar{Y} = \frac{\bar{Y}_{max}}{1 + \frac{K_d}{[L]}} \quad (1)$$

En esta ecuación  $\bar{Y}$  corresponde a la fracción de saturación,  $\bar{Y}_{max}$  es la fracción de saturación máxima,  $K_d$  es la constante de disociación y  $[L]$  es la concentración de ligante. Dado que el modelo de la isoterma de Langmuir o Michaelis-Menten sólo se aplica a enzimas con comportamiento hiperbólico, no cooperativas, se han hecho diferentes esfuerzos por crear modelos que se ajusten y ofrezcan una explicación física del fenómeno de la cooperatividad.

### 2.2.1 La ecuación de Hill

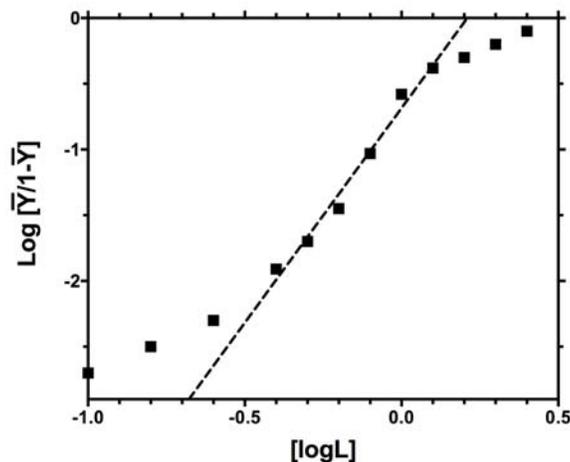
Archibald Hill propuso una de las primeras explicaciones de la cooperatividad en términos matemáticos, una ecuación que se ajusta de manera precisa a las curvas de velocidad o de saturación cooperativas.

$$\bar{y} = \frac{[L]^h}{S_{0.5}^h + [L]^h} \quad (2)$$

En donde  $[L]$  representa la concentración de ligante,  $S_{0.5}$  es la concentración de ligante a la cual se alcanza la mitad de la saturación ( $\bar{y} = 0.5$ ) y  $h$  es un exponente empírico, llamado coeficiente de Hill.

El coeficiente de Hill, es un número positivo cuyo valor representa el tipo de cooperatividad. Cuando  $h$  es mayor que 1 significa cooperatividad positiva, en donde  $h$  no puede ser más grande que el número de subunidades que formen a la proteína. En el caso contrario en el que  $h$  es menor a 1, se interpreta como cooperatividad negativa, la cual se entiende como la unión inicial a una de las subunidades de alta afinidad, es seguido por una disminución en la afinidad en la unión del ligante. Este no puede diferenciarse de la unión de dos poblaciones en equilibrio con distintas constantes de afinidad por el mismo sustrato. El último caso es aquel en el que  $h$  es igual a 1, haciendo que la ecuación de Hill se simplifique a la ecuación de Michaelis-Menten, es decir, que no haya cooperatividad [7]. El coeficiente de Hill se puede calcular a partir de la pendiente del Gráfico de Hill, que se muestra en la figura 2.

A pesar de que la ecuación de Hill se ajusta de manera muy exacta a los datos experimentales de proteínas cooperativas, carece de un modelo físico, que le de sustento y significado a cada uno de los parámetros, en particular al coeficiente de Hill; por ello es que esta ecuación es empírica.



**Figura. 2** Gráfica de Hill  $\log \left[ \frac{Y}{1-Y} \right]$  en función de la concentración de logaritmo de la concentración de ligante. La línea discontinua representa el ajuste a una línea recta de los puntos experimentales intermedios. La pendiente de esa línea recta corresponde al valor del coeficiente de Hill.

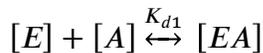
Sin embargo, la ecuación de Hill sigue siendo la primera manera de estudiar un fenómeno de cooperatividad en las proteínas, gracias al valor de coeficiente de Hill, el cual ha

servido como parámetro para medir la cooperatividad de los fenómenos de unión de ligante.

### 2.2.2 Ecuación de Adair

El pionero en el estudio de la cooperatividad utilizando como modelo de estudio la unión del oxígeno a la hemoglobina fue Gilbert S. Adair. Sus experimentos le permitieron demostrar que la estequiometría de unión era de 4 moléculas de oxígeno por molécula de hemoglobina, cada una con diferente afinidad, reportando así una de las primeras curvas sigmoides de saturación. Para explicar sus observaciones con respecto a la unión del oxígeno, Adair propuso una ecuación tomando en cuenta los cuatro sitios. A continuación se muestra la derivación de la ecuación para el caso de una proteína dimérica.

Se toma en cuenta que los dos sitios de unión están desacoplados. En ese caso las dos constantes de disociación,  $K_{d1}$  y  $K_{d2}$  están definidas por los siguientes equilibrios:



En donde E es la proteína, y A es la molécula ligante. La función de fracción de saturación ( $\bar{Y}$ ), que refleja la fracción de subunidades de la proteína unidas al ligante A, está definida por la siguiente expresión.

$$\bar{Y} = \frac{\text{Número de subunidades unidas a A}}{\text{Total de especies ligadas y vacías}} \quad (3)$$

Para expresar la fracción de saturación en términos de los diferentes complejos proteína ligante, primero los definimos como  $[E]$  = ambas subunidades vacías,  $[EA]$  = una subunidad ocupada y otra vacía y  $[EA_2]$  = ambas subunidades ocupadas.

El número de subunidades unidas a A, corresponde a  $[EA] + 2[EA_2]$ , mientras que el total de especies ligadas y vacías es  $2([E] + [EA] + [EA_2])$ . Sustituyendo en la ecuación de fracción de saturación se obtiene:

$$\bar{Y} = \frac{[EA] + 2[EA_2]}{2([E] + [EA] + [EA_2])} \quad (4)$$

A continuación definimos las dos constantes de disociación.

$$K_{d1} = \frac{[E][A]}{[EA]} \quad \text{y} \quad K_{d2} = \frac{[EA][A]}{[EA_2]}$$

Despejando  $[EA]$  y  $[EA_2]$  y sustituyendo en la ecuación anterior, al simplificar eliminando  $[E]$  se obtiene:

$$\bar{Y} = \frac{\frac{[A]}{K_{d1}} + \frac{2[A]^2}{K_{d1}K_{d2}}}{2\left(1 + \frac{[A]}{K_{d1}} + \frac{[A]^2}{K_{d1}K_{d2}}\right)} \quad (5)$$

A continuación consideramos que existe una constante de disociación intrínseca de cada sitio por subunidad  $K_a$ . Esta constante la tiene cada sitio cuando la proteína está en ausencia de ligante, por lo tanto ambas subunidades tienen la misma afinidad por la unión del ligante. Las constantes de disociación  $K_{d1}$  y  $K_{d2}$  se relacionan con la constante intrínseca  $K_a$  mediante coeficientes estadísticos. Cuando la proteína está vacía y el ligante se une al primer sitio, la probabilidad de unión es de  $1/2$ , por lo tanto  $K_{d1} = K_a/2$ . De igual manera, para la unión del segundo ligante, la probabilidad de aumenta debido a que uno de los sitios ya está ocupado, y dado que el primer ligante se unió al azar, ambos sitios tienen probabilidad de unir al ligante, por lo tanto  $K_{d2} = 2K_a$ . Expresando la ecuación 5 en términos de  $K_a$  obtenemos:

$$\bar{Y} = \frac{\frac{[A]}{K_a} + \frac{[A]^2}{K_a^2}}{1 + \frac{2[A]}{K_a} + \frac{[A]^2}{K_a^2}} \quad (6)$$

Finalmente, consideramos ahora que los sitios no están desacoplados y que la unión del ligante A al primer sitio, afecta la unión al segundo sitio por un factor  $\gamma$ . Bajo este supuesto, la ecuación 6 se puede expresar de la siguiente forma:

$$\bar{Y} = \frac{\frac{[A]}{K_a} + \frac{[A]^2}{\gamma K_a^2}}{1 + \frac{2[A]}{K_a} + \frac{[A]^2}{\gamma K_a^2}} \quad (7)$$

En esta ecuación el valor de  $\gamma$  determina la cooperatividad de la curva. Cuando  $\gamma < 1$  la gráfica de  $\bar{Y}$  contra  $[A]$  es una curva sigmoide, que se ajusta al fenómeno de cooperatividad. Cuando  $\gamma = 1$  se obtiene una curva hiperbólica, es decir, que no presenta cooperatividad. Finalmente cuando  $\gamma > 1$ , la curva obtenida presenta una desviación de la hipérbola y simboliza un caso en el cuál la unión del primer ligante disminuye la afinidad del segundo sitio por el mismo ligante. Dado a que este fenómeno es contrario a lo que se definió como cooperatividad, se le ha llamado cooperatividad negativa.

Sin embargo, cuando la ecuación de Adair considera más de dos sitios, pueden existir situaciones en las que la unión del ligante al primer sitio favorezca la unión al segundo sitio, mientras que la unión de esta segunda molécula disminuya la afinidad por la tercera. Este tipo de situaciones los parámetros de la ecuación de Adair no pueden relacionarse con el comportamiento fisiológico de las proteínas cooperativas [8]. Para ello se pueden emplear otro tipo de ecuaciones y modelos que se describirán a continuación.

### 2.2.3 Modelo concertado de Monod, Wyman & Changeux (MWC).

Uno de los modelos más influyentes para explicar el fenómeno de cooperatividad y alostería, fue el propuesto en conjunto por Jaques Monod, Jeffries Wyman y Jean-Pierre Changeux (MWC) en 1965 [9]. Como antecedentes del desarrollo teórico de Monod, Max Perutz ya había resuelto las estructuras de la *oxi* y la *desoxi* hemoglobina [10]. Para entonces Monod y colaboradores contaban con la evidencia del cambio conformacional en la hemoglobina, que existía en dos conformaciones estructuralmente diferentes dependiendo del estado de ligación con oxígeno; además se sabía que en ambas estructuras la organización de los monómeros era simétrica. Esta simetría se asume con la ayuda de la obtención de los cristales.

Con esta evidencia, el modelo MWC parte de las siguientes premisas:

- La molécula debe poseer al menos un eje de simetría.
- Cada subunidad de la proteína oligomérica posee sólo un sitio de unión al ligante.
- A medida que se va uniendo el ligante a las diferentes subunidades, la simetría se mantiene.
- La conformación de una subunidad está determinada por la interacción con otra subunidad.
- Como consecuencia, la afinidad de un ligante en un oligómero se altera al ocurrir la transición de un estado a otro.
- Cuando la proteína pasa de un estado a otro, su simetría se mantiene.

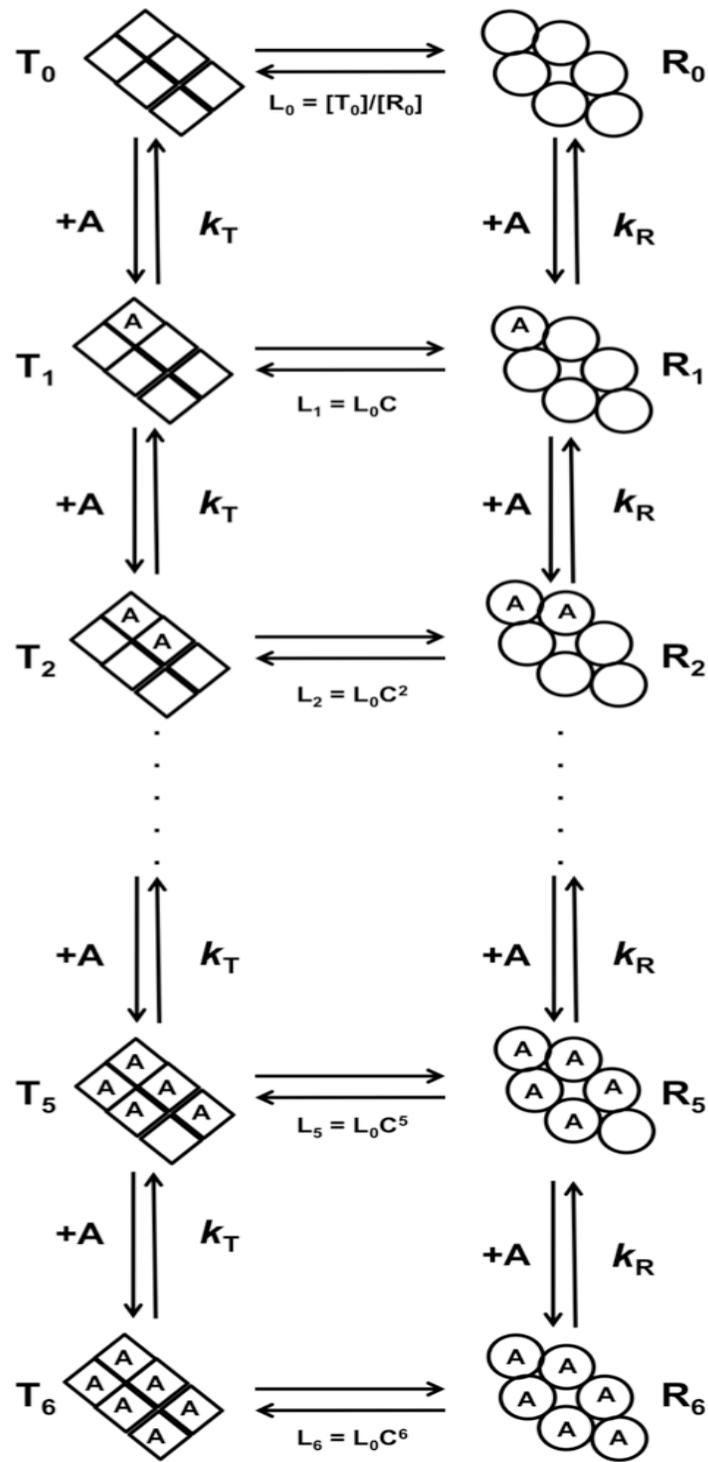


Figura 3. Esquema del modelo MWC.  $T_0$  y  $R_0$  corresponden a los conformeros de baja y alta afinidad respectivamente en ausencia de ligante.  $L$  corresponde a la constante de equilibrio conformacional.  $C$  representa el cociente entre las constantes de disociación;  $K_R/K_T$ .  $A$  corresponde al ligante [11]

Hasta ahora, los estados a los que hacen referencia los postulados del modelo MWC corresponden a los dos estados estructurales que se observaron cristalográficamente al estar la hemoglobina con o sin oxígeno ligado. A cada estado se le conoce como confórmero. Al confórmero sin ligante se le llamó T por tenso, mientras que al confórmero con ligante se le llamó R por relajado. El modelo MWC asume que existen estos dos confórmeros en diferentes proporciones, cuyas constantes de asociación por el ligante son diferentes. T es el estado de baja afinidad por el oxígeno, mientras que R es el estado de alta afinidad y ambos confórmeros se encuentran en equilibrio. En ausencia de ligante el equilibrio favorece a la población de baja afinidad, T. Conforme la concentración de ligante aumenta, se induce el cambio conformacional que lleva a la proteína del estado T al estado R, y el equilibrio ahora favorece a la conformación de alta afinidad [9].

Esquemáticamente el modelo MWC se representa en la figura 3.

A partir de los postulados precedentes, se dedujo la ecuación que describe al modelo.

$$\bar{y} = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1} + L_0 c \alpha (1+c\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L_0 (1+c\alpha)^n} \quad (8)$$

En donde  $\alpha$  es igual a  $\frac{[A]}{K_R}$ ,  $[A]$  es la concentración de ligante y  $K_R$  es la constante de disociación de A correspondiente al confórmero R;  $c$  es el cociente entre las constantes microscópicas de disociación de cada confórmero ( $\frac{K_R}{K_T}$ ),  $L_0$  es conocida como la constante alostérica y representa la constante de equilibrio de  $R \rightleftharpoons T$  en ausencia de ligante,  $\frac{[T_0]}{[R_0]}$ .

Finalmente  $n$  es el número de sitios de unión al ligante de la proteína oligomérica.

En el caso en el que la constante  $c$  es igual a 1, es decir, que no exista diferencia en las afinidades de los confórmeros T y R, o que la constante de equilibrio  $L$  sea cercana a 0, ésta ecuación se reduce a la forma:

$$\bar{y} = \frac{\alpha}{1 + \alpha} = \frac{[A]}{K_R + [A]} \quad (9)$$

Que corresponde a la ecuación 1.

Con el sustento de un modelo y basado en la evidencia estructural de la hemoglobina, los valores experimentales de saturación de oxígeno se ajustaron a la ecuación de 8 e incluso los valores experimentales de otras proteínas también se ajustaron.

El modelo MWC representó un avance el estudio de la hemoglobina utilizándose incluso en otras proteínas. Una de las grandes contribuciones del modelo MWC fue la unificación de la cooperatividad y alostería en un solo modelo, siendo así evidente la estrecha relación entre ambos fenómenos [12].

#### 2.2.4 Ecuación de la suma lineal de dos hipérbolas

En algunas situaciones una proteína puede presentar diferentes afinidades por su ligante, esto debido a diferentes isoformas, estados conformacionales, estados oligoméricos etc. Cuando se tiene una mezcla de las dos formas de la proteína con diferentes afinidades, la curva de saturación observada es el resultado de la combinación de dos eventos de unión.

Un método para analizar este tipo de sistemas es el empleado en el artículo de Zonszein *et al* [13]. En ese trabajo se desacopló la comunicación entre subunidades en la Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli*. Utilizando diferentes concentraciones de ligante alostérico se establecieron, en distintas proporciones, dos poblaciones conformacionales con diferente afinidad por su sustrato.

Para ajustar las curvas de velocidad se utilizó la siguiente ecuación:

$$\left[ \frac{(n-i)V_t X}{K_t + X} + \frac{i(V_r X)}{K_r + X} \right] \quad (10)$$

Esta ecuación corresponde a la combinación lineal de dos uniones hiperbólicas.  $K_t$  y  $K_r$  son las constantes de baja y alta afinidad respectivamente,  $n$  es el número total de sitios disponibles para unir al sustrato  $X$ . El parámetro  $i$  representa el número de sitios de alta afinidad, mientras que  $n-i$  los de baja afinidad. En este ejemplo en particular se incluyen los valores de velocidad máxima para cada población  $V_t$  y  $V_r$ , no obstante esta ecuación puede ser utilizada para ajustarse a datos de saturación con un ligante, no necesariamente a velocidades de catálisis [13].

### 2.2.5 Regráfico de Eadie Scatchard

Este regráfico se utiliza para estudiar la unión de un ligante con la proteína, cuando se quiere observar la dependencia del cociente entre ligante unido/ ligante libre, en función de la concentración de ligante unido.

El gráfico de Scatchard es una línea recta con pendiente de  $1/K_d$ , en donde  $K_d$  es la constante de disociación de la proteína por el ligante. Una ventaja de utilizar este gráfico es que es poco sensible al error experimental, a diferencia de otros gráficos como el de dobles recíprocos.

Además, el gráfico de Scatchard es muy útil para detectar si existe alguna variación en la constante de disociación, fenómeno que ocurre en las proteínas cooperativas, en donde la constante disminuye a medida que aumenta la concentración de ligante unido. En este caso el gráfico de Scatchard presenta una concavidad hacia arriba.

Por otra parte cuando se presenta una heterogeneidad de especies, también conocida como cooperatividad negativa, el gráfico de Scatchard muestra una concavidad hacia abajo.

Cuando analizamos un comportamiento hiperbólico el gráfico será una línea recta.

A continuación se muestra un gráfico de Scatchard (figura 4) que simula la unión hiperbólica, una unión con cooperatividad negativa aparente y una unión con cooperatividad positiva [7].

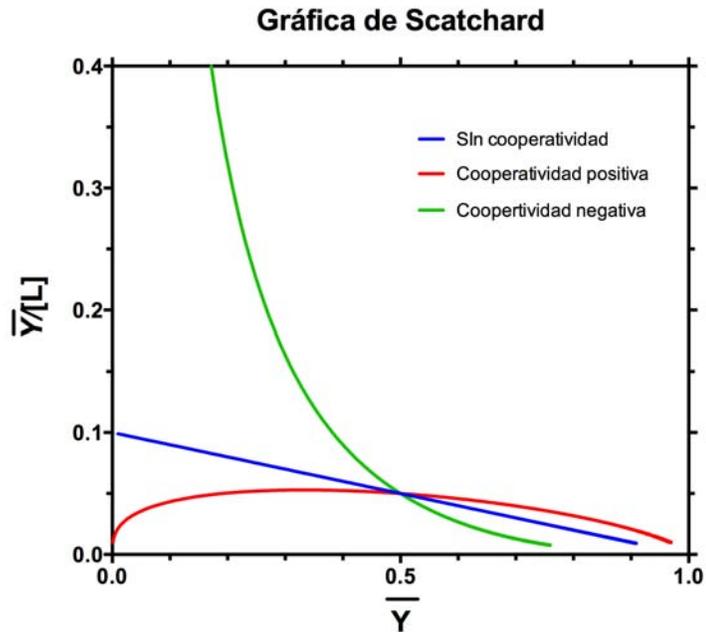


Figura 4. Gráfico de Scatchard. La línea azul muestra una unión sin cooperatividad, es decir, hiperbólica. La línea roja muestra cómo se vería la unión cooperativa de un ligante. La línea azul muestra el comportamiento de cooperatividad negativa aparente.

#### 2.2.6 Regráfico Acerenza-Mizraji

A pesar de que el análisis por la ecuación de Hill y el gráfico de Scatchard, son los métodos más utilizados para determinar la presencia de cooperatividad, también existe otro método sensible para los casos en los que la cooperatividad es sutil.

Cuando la saturación de una proteína con su ligante es hiperbólica, el valor de la constante de disociación es fijo. Al graficar el valor de la constante en función de la concentración de ligante, se obtiene una línea recta con pendiente igual a cero, y ordenada al origen igual a la  $Kd$ .

No obstante, en el caso de las proteínas cooperativas, la constante de disociación cambia de valores altos a valores bajos a medida que aumenta la concentración de ligante. Esto se puede conocer a partir de reordenar la ecuación 1.

$$K_{app} = [A] \left( \frac{\bar{Y}_{max}}{\bar{Y}} - 1 \right) \quad (11)$$

En donde  $K_{app}$  es la constante de disociación aparente, llamada originalmente por los autores como cociente global de disociación.

Este gráfico (figura 5), también puede detectar cooperatividad positiva, en este caso la constante de disociación cambia de valores bajos a valores altos, a medida que aumenta la concentración de ligante [6].

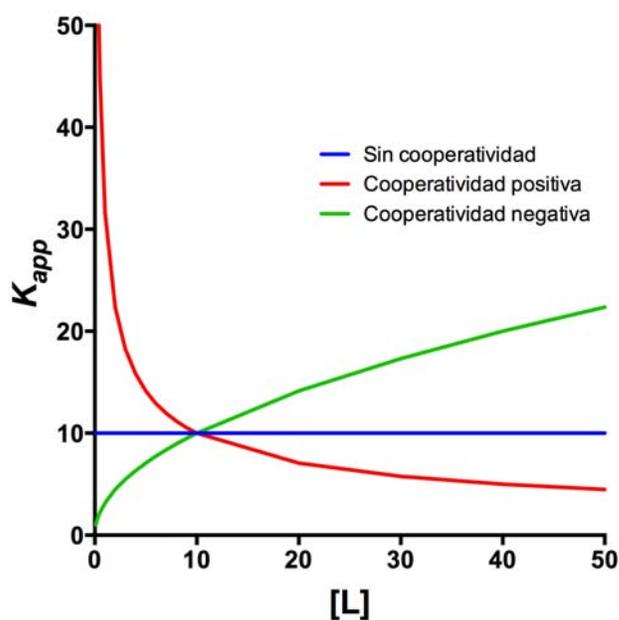


Figura 5. Gráfico Acerenza-Mizraji. La línea azul muestra una unión sin cooperatividad, es decir, hiperbólica. La línea roja muestra cómo se vería la unión cooperativa de un ligante. La línea azul muestra el comportamiento de cooperatividad negativa aparente.

### 2.3 Familia ROK.

Existen diferentes familias dentro de las proteínas, y específicamente para los represores transcripcionales la más estudiada es la familia LacI/GalR. Otro tipo de familia de proteínas, es la familia ROK (represores, marcos de lectura abierta y cinasas) se encuentra la subfamilia de represores, donde las proteínas Mlc y NagC son las más representativas.

Mlc y NagC son proteínas homólogas, y ambas actúan como represores de la transcripción en *E. coli*. Mlc reprime los genes implicados en la captación de glucosa, mientras que NagC controla el uso de la *N*-acetil-Glucosamina (GlcNAc).

Estas proteínas comparten 40% de identidad, y 70% de similitud. Aunque Mlc y NagC tienen funciones diferentes en *E. coli*, es sorprendente que las secuencias del dominio de unión a DNA Hélice-vuelta-hélice (H-T-H) situado en el *N*-terminal son muy parecidas (figura 6).

NagC	I SRIQIAEQS QLAPASVTKITRQ
Mlc	VSRIDLSRLA QLAPASITKIVRE

Figura 6. Comparación de los dominios de unión al DNA H-T-H, los aminoácidos conservados se muestran en negritas. Imagen tomada y modificada de El Qaidi *et al.* [13]

Los dominios *C*-terminales también son homólogos, pero el mecanismo de inducción que provocan el desplazamiento de cada proteína por la unión a sus sitios son muy diferentes [14].

### 2.4 NagC

Los operones divergentes *nagE-BACD* codifican proteínas implicadas en la captación y degradación de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y son dependientes entre otras cosas del complejo AMPc/Crp. El gen *nagE* codifica el componente dos del transportador del sistema de fosfotransferasa específico para la *N*-acetilglucosamina-6-fosfato (GlcNAc6P). Los genes *nagB* y *nagA* codifican las proteínas necesarias para el

catabolismo de GlcNAc6P hacia la producción de fructosa-6-P y NH<sub>3</sub> (figura 7) [15]. También se piensa que está involucrado en el reciclaje de la pared celular.

El represor NagC, está codificado por el gen *nagC*, codifica para un polipéptido de 406 aminoácidos y 44 kDa por subunidad. NagC se une a los dos regiones operadoras del operon *nag*. Estas dos regiones se encuentran junto con los promotores, formando un “loop” de represión. Estos operadores se encuentran separados por 93 pares de bases, es decir, por nueve vueltas de DNA en forma de doble hélice B, de modo que las dos cajas se encuentran orientadas hacia la misma cara del DNA.

NagC no solo reprime los operones divergentes *nagE-nagBACD* tiene diferentes sitios de unión dentro del cromosoma de *E. coli*.

Al igual que muchos operones involucrados en la utilización de aminoazúcares, los genes están sujetos a represión catabólica.

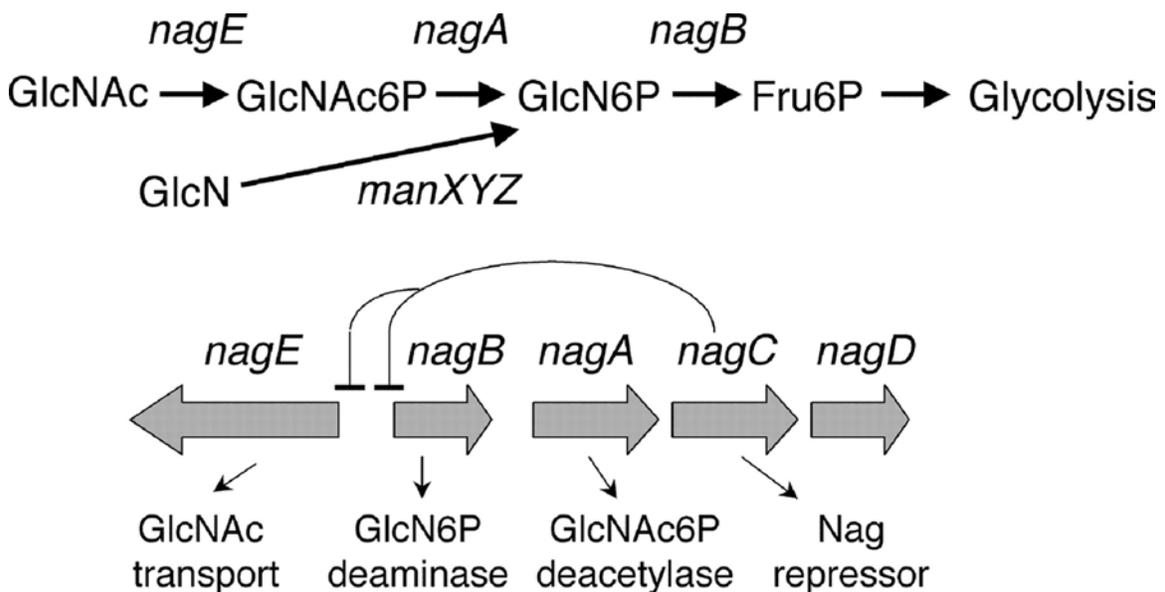
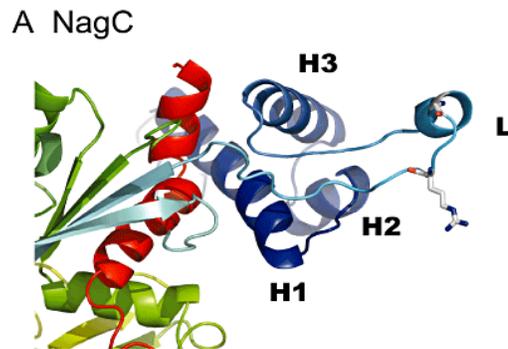


Figura 7. Modelo de regulación de los operones divergentes *nagE-BACD* por NagC. Imagen tomada de Álvarez *et al* [15].

Existen diferentes dominios estructurales que le permiten a las proteínas reconocer y unirse al DNA. En el caso de NagC, y como en la mayoría de los procariontes, el dominio que se encuentra con mayor frecuencia, es el H-T-H. Este dominio consta normalmente

de tres hélices alfa de las cuales las 2 y 3 forman el dominio H-T-H y 1 estabiliza la estructura (figura 8). La hélice 3 es descrita comúnmente como la hélice de reconocimiento, ya que los aminoácidos de esta hacen contacto con en el surco mayor del DNA [16].

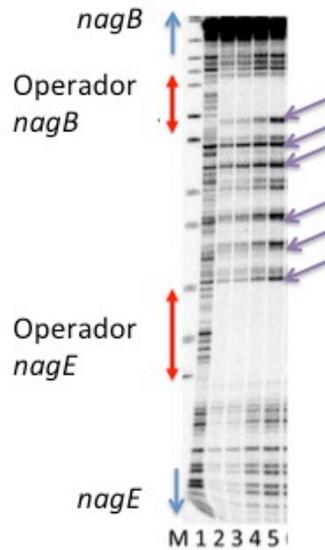


**Figura 8. Modelo del dominio de unión al DNA de NagC . Imagen tomada de Pennetier, *et al.* [16].**

Cuando una proteína o un complejo de proteínas se unen simultáneamente a dos sitios diferentes en el DNA se forma un “loop” de represión [17]. Este fenómeno de represión se ha estudiado tanto experimental a nivel teórico. La figura 9 representa cómo NagC se une simultáneamente a dos sitios de unión creando un “loop”, que abarca generalmente unos cientos de pares de bases. Este “loop” bloquea la actividad de la RNA polimerasa, ya sea impidiendo la unión o atrapándola en el “loop” sin ser capaz de reclutar otras proteínas activadoras como la proteína receptora de AMP cíclico (CRP), impidiendo la expresión de los operones *nagBACD-nagE*. Este mecanismo de represión se ha observado también en los operones de lactosa, arabinosa, de *E. coli*.

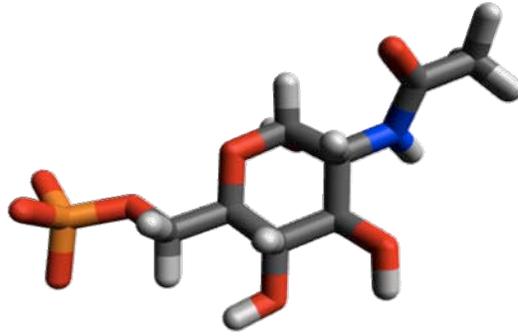
Se han utilizado varias técnicas diferentes para demostrar la existencia de un “loop” de DNA. Algunas de estas técnicas son de la biología molecular clásica, mientras que otras implican la utilización de microscopía electrónica. Una de estas técnicas es el “footprint”, esta técnica muestra el lugar preciso donde una proteína reguladora puede unirse a una secuencia de DNA [18]. Este método está basado en la protección que la proteína le da al DNA en contra de la actividad enzimática de una DNasa. Se ha observado un patrón

hipersensible a la DNasa cuando existe la formación de un loop de represión, este patrón se observa cada 10 u 11 pares de bases [19].



**Figura 9. Footprint que demuestra la formación de loop entre la región de los operadores *nagB-nagE*. Figura tomada y modificada de Gaugué *et al* [19]. La letra M debajo del carril señala el patrón del peso molecular. Los carriles enumerados de izquierda a derecha representan concentraciones descendentes de NagC. Con flechas azules se señalan las regiones que corresponden a los genes *nagB* y *nagE* y con flechas rojas las regiones correspondientes a las regiones operadoras. Las flechas moradas señalan los sitios de corte hipersensibles que demuestran la existencia de la formación de un loop de represión.**

NagC se desplaza de la región operadora blanco mediante la interacción con GlcNAc6P. Esta molécula no solo juega un papel importante como molécula inductora de NagC, también es la molécula que activa a la enzima alostérica codificada en el mismo operón: NagB.



**Figura 10. Molécula de *N*-acetilglucosamina 6-fosfato, molécula inductora de NagC.**

## **2.5 Espectroscopía de fluorescencia.**

La fluorescencia es un fenómeno espectroscópico de carácter radiactivo. En algunas moléculas con características químicas particulares, los electrones excitados por la incidencia de un fotón, pasan a un nivel energético más alto; posteriormente al regresar los electrones a su estado energético basal, parte de la energía se emite en forma de fotones. Los fotones de emisión son de menor energía que los fotones de excitación, es decir la longitud de onda de excitación  $\lambda_{ex}$  es menor a la de emisión  $\lambda_{em}$  [20].

Las proteínas regularmente tienen fluorescencia intrínseca debido a la presencia de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptofano). De estos aminoácidos el que presenta mayor rendimiento cuántico es el triptofano. El rendimiento cuántico es la fracción de fotones que se obtienen en la emisión al excitar a un fluoróforo [20].

### 3.- Planteamiento del problema

NagC es una proteína alostérica con un sitio de unión al DNA en su *N*-terminal y un sitio de unión a la GlcNAc6P. Cada ligante induce un cambio conformacional diferente. El cambio conformacional que produce la GlcNAc6P en NagC cuando está unida al DNA repercute en la expresión de varios genes involucrados en el metabolismo de aminoazúcares, es decir, cuando NagC se une a los operadores *nagB* y *nagE* formando un loop de represión impide la expresión de los operones divergentes *nagE-nagBACD*.

La GlcNAc6P no solo participa dentro de la célula como la molécula inductora de NagC, también es la activadora alostérica de la enzima codificada por el gen *nagB*, por lo tanto, es interesante conocer cuáles son las diferentes afinidades de NagC por sus diferentes ligantes y cómo estas afinidades influyen en la fisiología de *Escherichia coli*.

#### **4.- Hipótesis**

Si NagC forma un loop de represión que impide la expresión de los operones divergentes *nagE-nagBACD* en ausencia *N*-acetilglucosamina en el medio, entonces la afinidad de NagC por ambas regiones operadoras tendrá que ser similar para poder favorecer la formación del loop. Por lo tanto el valor de la afinidad de NagC por la molécula inductora dependerá de la formación del complejo NagC-DNA.

## 5.- Objetivo general

Determinar las propiedades estructurales y de unión de la GlcNAc6P y de las regiones operadoras *nagB* , *nagE* y *nagE s.o.*

## 6.- Objetivos particulares

Sobreexpresar y purificar la proteína NagC de *Escherichia coli*.

Determinar las condiciones de estabilización de NagC

Calcular la constante de disociación de NagC por su molécula inductora (GlcNAc6P) en distintos estados ligados.

Calcular las constantes de disociación de NagC por los operadores *nagB* , *nagE* y *nagE s.o.*

Determinar el estado oligomérico de NagC en ausencia y presencia de ligantes (operadores y GlcNAc6P).

## **7.- Materiales y métodos.**

### **7.1 Cepas**

Las cepa utilizada en este trabajo, para purificar la proteína NagC, fue *E. coli* BL21 *Δnag* PRARE PJES/NagCH6 resistente a ampicilina. Esta cepa fue construida previamente en el laboratorio de la Dra. Jacqueline Plumbridge de la siguiente manera: el gen *nagC* fue amplificado con un oligonucleótido río arriba que incorporó un sitio de restricción *NdeI* en el codón de inicio AUG, y un oligonucleótido río abajo que incorporó seis histidinas seguidas por el sitio de restricción *EcoRI*. El fragmento amplificado fue digerido con *NdeI* y *EcoRI* y fue clonado en el vector pJES307. Este plásmido es un vector de expresión basado en la inducción con IPTG de la RNA polimerasa de T7. El plásmido resultante pJES/NagC-H6 fue transformado en *E. coli* BL21Star (Invitrogen) [14].

La cepa BL21 *Δnag* PRARE PJES/NagCH6 resistente a ampicilina se dejó crecer en medio LB con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL hasta llegar a una OD<sub>550</sub> de 0.6 nm, posteriormente se indujo la sobreexpresión de NagC con IPTG a una concentración final de 1 mM durante 4 h a 37°C a 250 rpm.

Obtuvimos la masa celular en tubos Corning de 500 mL centrifugando 15 minutos a 4°C a 5,000 rpm. El pellet se sonicó con 10 mL de amortiguador de lisis (350 mM NaCl, 35 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM imidazol pH 6.3) y se separaron los residuos celulares centrifugando 45 minutos a 4°C a 15,000rpm.

### **7.2 Purificación por cromatografía de afinidad por Niquel.**

Se empacó la columna con agarosa Protino® Ni-TED (Macherey- Nagel). El volumen de la columna fue de 12 mL aproximadamente. Se equilibró la columna con 35ml de amortiguador de lisis (aproximadamente 3 volúmenes). El sobrenadante que se obtuvo después de la centrifugación se pasó por la columna previamente equilibrada.

Después de que pasara lentamente el sobrenadante se pasaron otros 3 volúmenes de amortiguador de lisis.

Se añadieron 20 mL del amortiguador de la primera elución (350 mM NaCl, 35 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM imidazol pH 6.3), y se recolectaron fracciones de 2 mL.

Por último se añadieron 10 mL de amortiguador de la segunda elución (350 mM NaCl, 35 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM imidazol pH 6.3) y se recolectaron fracciones de 1 mL.

Se corrieron las fracciones de las dos eluciones en un gel de acrilamida 12% en condiciones desnaturalizantes.

Las fracciones con NagC se juntaron y se concentraron en polietilenglicol hasta llegar a un volumen de 5 mL.

### **7.3 Purificación por cromatografía de exclusión molecular.**

Se purificó una fracción de 5 mL en una columna HiLoad 16/600 Superdex 200 previamente equilibrada con amortiguador 350 mM NaCl, 35 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.3 a un flujo de 1 mL/min. Las fracciones se analizaron en un gel de acrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes.

Las fracciones con NagC se juntaron y se concentraron quedando en glicerol al 50 %.

En estas condiciones se almacenó la proteína a -20°C.

### **7.4 Concentración de proteína.**

Se determinó la concentración de la proteína mediante el método de ácido bicinconínico [21] y posteriormente se calculó con el coeficiente de extinción molar.

### **7.5 Ensayos de fluorescencia.**

#### Espectrofluorómetro ISS PC1

NagC tiene un único residuo de Trp y ocho residuos de Tyr por lo tanto se verificó si había una señal intrínseca propia de la proteína que nos permitiera estudiar la unión de los diferentes ligantes. Se llevó a cabo un ensayo de detección del cambio del espectro de emisión de fluorescencia en el espectrofluorómetro ISS PC1 (ISS Inc., Champaign, IL.). Se probaron tres concentraciones de proteína 0.1µM, 0.5µM y 1µM (concentración calculada para un dímero de NagC) a una temperatura constante de 30°C, en una celda de

cuarzo Hellma de 10mm de paso de luz (101-QS). Probamos diferentes longitudes de excitación cada 5 nm a partir de  $\lambda = 270-295\text{nm}$ , se colectó el espectro de emisión de 290-400nm. El máximo de emisión lo obtuvimos en 310nm excitando a 280nm. Las rejillas del paso de luz fueron de 2mm para emisión y 1mm de excitación.

Se determinó que había una mejor señal utilizando 0.5uM de proteína.

#### Shimadzu R F 5000U y Olis 071731-SLM8

Se realizó la titulación de NagC con GlcNAc6P añadiendo diferentes concentraciones de este ligante, obteniendo el espectro de emisión de cada concentración. Se observó el apagamiento de la intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión. El apagamiento de la intensidad de fluorescencia disminuye cuando aumenta la concentración de ligante.

Las siguientes titulaciones se realizaron con tres distintas secuencias correspondientes a diferentes regiones operadoras.

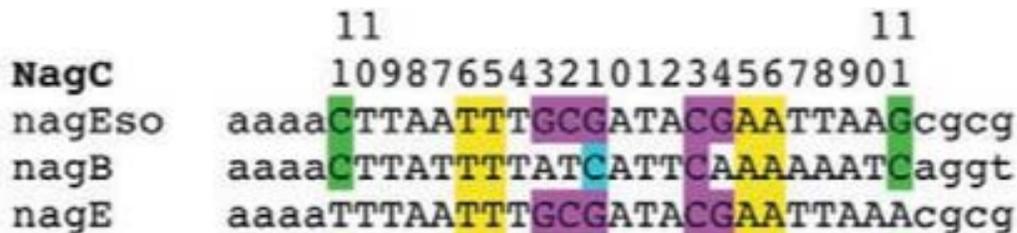


Figura 11. Alineamiento de los operadores de NagC utilizados en este trabajo. Los números indican las posiciones respecto al centro de simetría (0 posición central). El color de las bases se describe de la siguiente forma: amarillo indica las posiciones totalmente conservadas en los 3 operadores. En verde las bases C o G en la posición +/- 11 esta posición es la modificada en el súper operador *nagE s.o.* Las bases de la región central se resaltan en color rosa, y se ajustan al patrón GCCG. En azul se muestra una C que no muestra el patrón GCCG. Imagen tomada y modificada de Bréchemier-Baey *et al* [16].

Las regiones operadoras se mandaron sintetizar junto con su secuencia complementaria, y se hibridaron posteriormente.

Se observó que a diferencia de la GlcNAc6P, el DNA como ligante de NagC no sólo provoca un apagamiento de la intensidad de fluorescencia, sino que también genera un cambio en el centro espectral de masas.

Los valores obtenidos en los ensayos de fluorescencia se obtuvieron en la longitud de onda donde se encontró el máximo de emisión (310 nm). El cambio en el apagamiento de intensidad de fluorescencia se transformó en algunos casos a fracción de saturación  $\bar{y}$ .

## 7.6 Entrecruzamientos

Se dializó la proteína en un amortiguador con 350 mM de NaCl, 35 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a un pH 6.3, se midió la concentración de proteína y se utilizó en una reacción de 50  $\mu$ L a una concentración de 0.4 mg/mL, con 1.5% de Glutaraldehído durante 10 min a 30°C.

Se realizaron distintas reacciones probando las siguientes condiciones.

- NagC
- NagC+ *nagE* *s.o.*
- NagC+ *nagB*

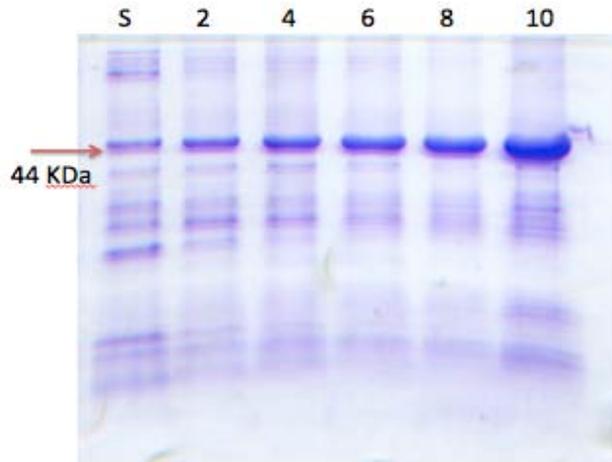
Después de transcurridos 10 min se detuvo la reacción añadiendo Tris 1 M pH 8. Cada reacción se analizó en un gel de acrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes

Se tiñeron los geles con el método de tinción de plata utilizando tiosulfato de sodio como agente reductor de Blum, *et al* [22].

## 8.- Resultados

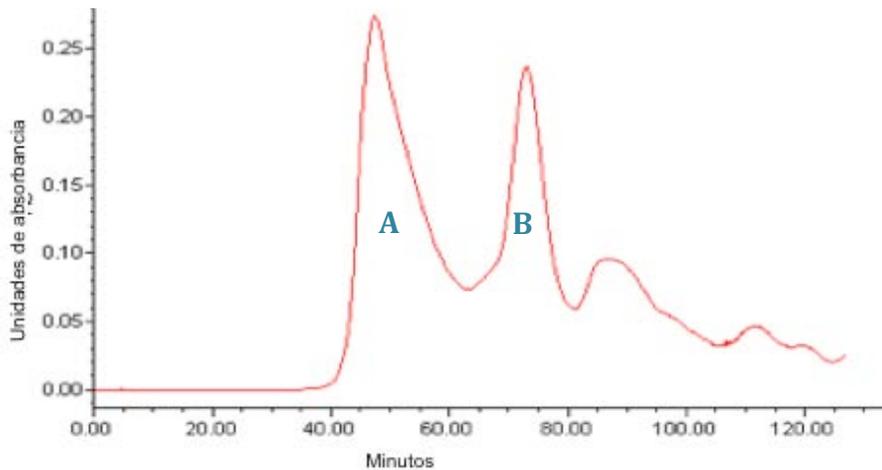
### 8.1 Sobreexpresión, purificación y estabilidad.

Después de sobreexpresar NagC y obtener el lisado de las bacterias, se procedió a realizar la purificación por cromatografía de afinidad de Niquel, obteniendo suficiente cantidad de proteína pero con bastantes impurezas.

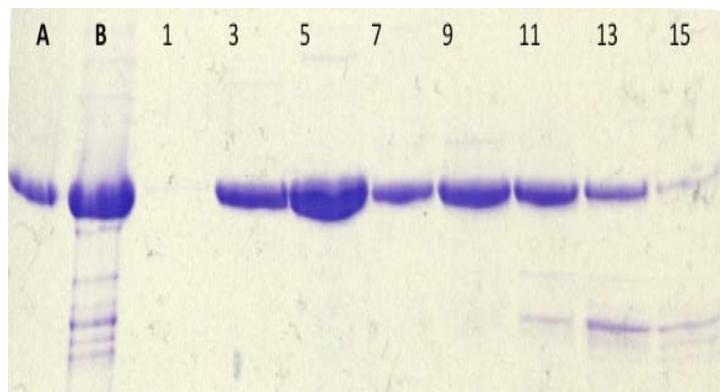


**Figura 12. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la purificación por cromatografía de afinidad. La “S” corresponde el carril que indica la sobreexpresión de NagC. Las fracciones están enumeradas de dos en dos según la fracción de elución.**

Como se describió anteriormente, concentramos las fracciones obtenidas (figura 12) y realizamos el segundo paso de purificación en una columna de cromatografía de exclusión molecular, obteniendo fracciones con un mayor grado de pureza. Al purificar la proteína por una columna exclusión molecular, se observan en el cromatograma (figura 13) dos picos definidos, que corresponderían a dos estados oligoméricos con diferente peso molecular. En la figura 14 se muestra el SDS PAGE de las fracciones obtenidas durante la purificación, las fracciones 3 y 5 corresponden al primer pico de absorbancia a 280 tiene un máximo de absorbancia a los 50 minutos de haber inyectado la proteína en el FPLC. Las fracciones 9 y 11 representan el segundo pico con un máximo de absorbancia obtenido a los 70 minutos aproximadamente.



**Figura 13. Cromatograma de la Purificación de NagC en una columna de exclusión molecular Superdex 16/ 60. La letra A y B corresponde a los dos picos de elución de la proteína al pasar por la columna de exclusión molecular, el tamaño del oligomero A es mayor respecto a B.**



**Figura 14. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas del segundo paso de purificación de NagC. Se comenzaron a colectar fracciones de un volumen de 2 mL 40 min después de inyectar la proteína en el FPLC. El FPLC tiene acoplada una columna de exclusión molecular Superdex 16/60. La letra A corresponde al carril donde se analizó la muestra control de NagC (proteína purificada en un lote diferente). El carril B corresponde a NagC purificada en una columna de afinidad a Níquel antes de realizar el segundo paso de purificación. Los números arriba de cada carril indican el número de fracción obtenida durante la purificación.**

Las fracciones obtenidas se concentraron en glicerol al 50% y los mililitros de proteína obtenida se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Esta proteína almacenada fue utilizada para los siguientes experimentos.

La estabilidad de NagC se observó al dializar la proteína purificada en diferentes amortiguadores:

- NaCl 350 mM y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 35 mM pH 6.3
- Tris-HCl 50 mM pH 7.8
- Tris-HCl 50 mM pH 6.3
- HEPES 25 mM, 100 mM glutamato de potasio pH 8.0 (con y sin albúmina bovina a una concentración 0.5 mg ml<sup>-1</sup>).
- HEPES 25 mM, 100 mM glutamato de potasio pH 6.3 (con y sin albúmina bovina a una concentración 0.5 mg ml<sup>-1</sup>).

El amortiguador en el que no se observaron agregados después de 8 horas de diálisis (con un cambio de amortiguador después de las primeras dos horas), fue el amortiguador de NaCl 350 mM y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 35 mM pH 6.3.

## 8.2 Titulación de NagC con sus diferentes ligantes medidos por fluorescencia.

Con el objeto de medir la afinidad que NagC tiene por sus ligantes, se llevó a cabo una búsqueda del espectro de emisión de NagC al excitar el Trp, y ver si esta señal cambia al titular NagC con GlcNAc6P (molécula inductora). En el siguiente gráfico (figura 15) se muestran los espectros de emisión del Trp antes y después de añadir concentraciones altas de la molécula inductora.

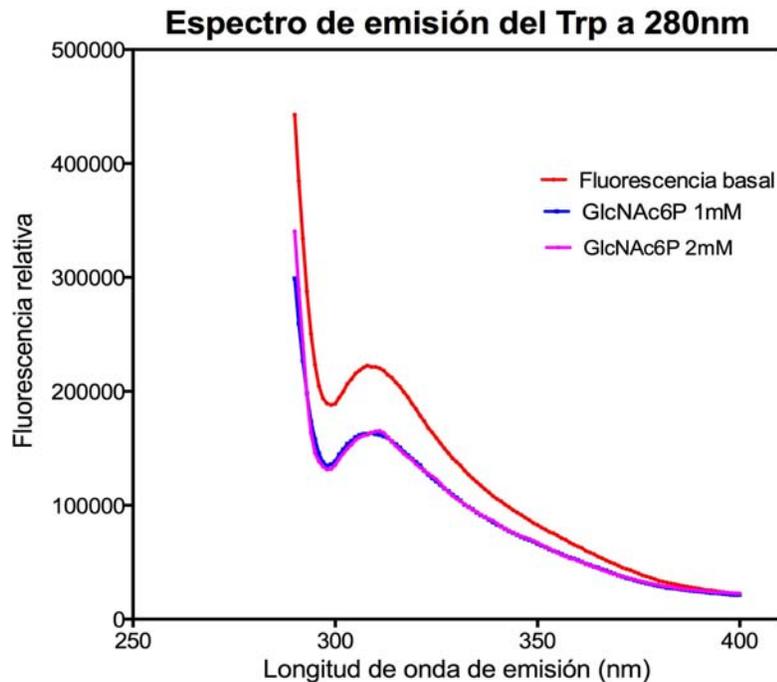


Figura 15. Espectros de emisión del Trp de NagC excitando a 280nm.

Realizamos una titulación de la NagC con tres regiones operadoras observando un apagamiento de la señal de fluorescencia del triptófano.

### 8.2.1 Titulación de NagC con las diferentes regiones operadoras

#### Titulación de NagC con el operador *nagB*

La interacción de NagC por el operador *nagB* muestra una unión con un comportamiento que se desvía del hiperbólico (figura 16), la cual se relaciona con una cooperatividad negativa al ajustar a la ecuación 2 que está libre de modelo. Esto puede ser interpretado como al menos dos especies oligoméricas distintas uniendo al DNA simultáneamente con diferentes afinidades, una de ellas tiene una  $K_{app}$  de 0.03  $\mu\text{M}$  y la segunda especie tiene una  $K_{app}$  de 0.7 $\mu\text{M}$  obtenidas por el ajuste a la ecuación 10. [12]

#### Titulaciones de NagC con los operadores *nagE* y *nagE* s.o.

En el caso de la titulación con la región operadora *nagE* observamos una saturación que, al analizarla por medio de regráficos sensibles a la presencia de cooperatividad positiva, en este caso los gráficos de Akerenza-Mizraji y de Scatchard se aprecia la presencia de sigmoidicidad (figura 17).

Para el análisis de esta curva utilizamos la ecuación 8 del modelo de Monod-Wyman-Changeux (MWC). Esta ecuación considera la presencia de dos formas ligantes de la proteína acopladas con diferentes constantes de disociación.

Las constantes de afinidad calculadas por medio de este análisis son consistentes con las constantes de alta y baja afinidad de la proteína por la región operadora NagB, no obstante, el mecanismo de unión de cada región operadora resulta ser diferente.

Por otra parte se encontró que NagC tiene una afinidad por la región *nagE* super operadora (s.o.) de 1.1  $\mu\text{M}$ , siendo esta una unión hiperbólica (figura 18), Este operador tiene dentro de la secuencia dos mutaciones puntuales respecto al centro de simetría del operador en las posiciones -11 y 11 (A por C y T por G respectivamente).

Las mutaciones de la región operadora nos demuestran un cambio de la afinidad de la proteína.

## Titulación de NagC con el operador *nagB*

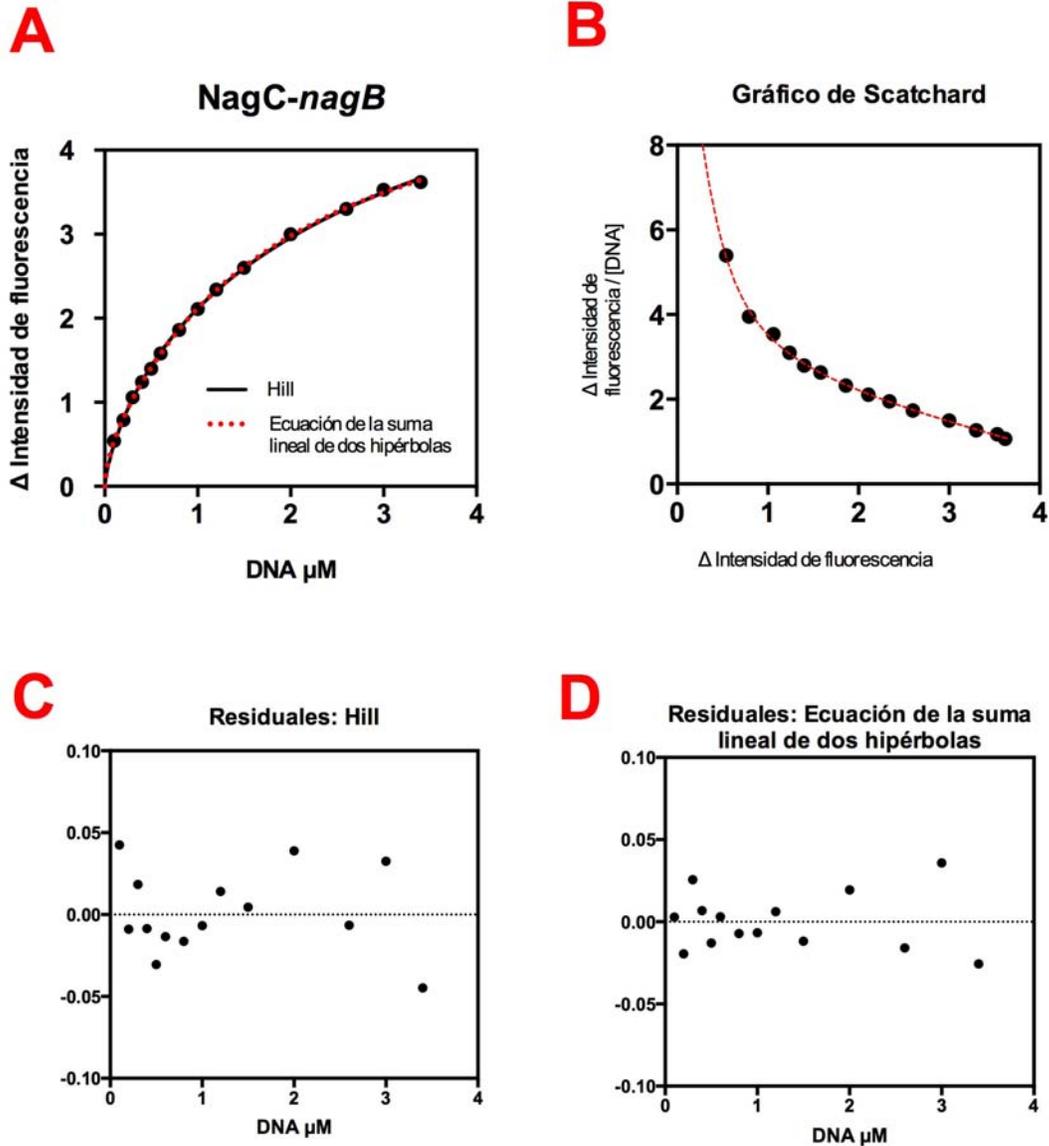


Figura 16. Experimentos de unión de NagC en función a la concentración del fragmento de DNA que corresponde a la región operadora *nagB*. La línea continua representa el ajuste de los valores experimentales a la ecuación 2, y la línea punteada representa el ajuste a la ecuación 10 [12]. B) Gráfico de Scatchard. C) Gráfico de residuales del ajuste a la ecuación 2. D) Gráfico de residuales del ajuste a la ecuación 10 [12].

## Titulación de NagC con el operador *nagE*

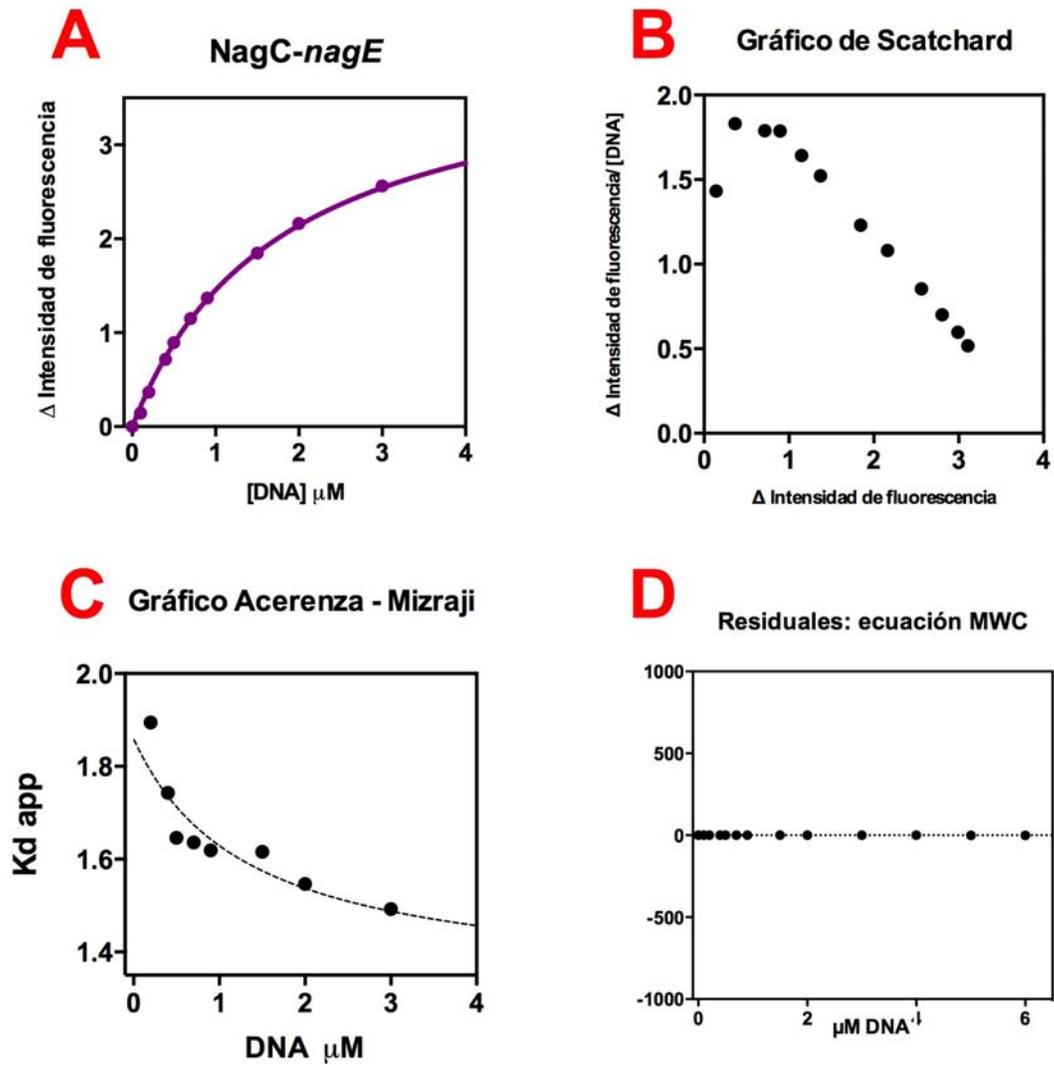


Figura 17. A) Experimentos de unión de NagC en función a la concentración del fragmento de DNA que corresponde a la región operadora *nagE*. La línea continua representa el ajuste de los valores experimentales a la ecuación 8 B) Gráfico de Scatchard. C) Gráfico Acerenza-Mizraji D) Gráfico de residuales del ajuste a la ecuación 8.

## Titulación de NagC con el operador *nagE s.o.*

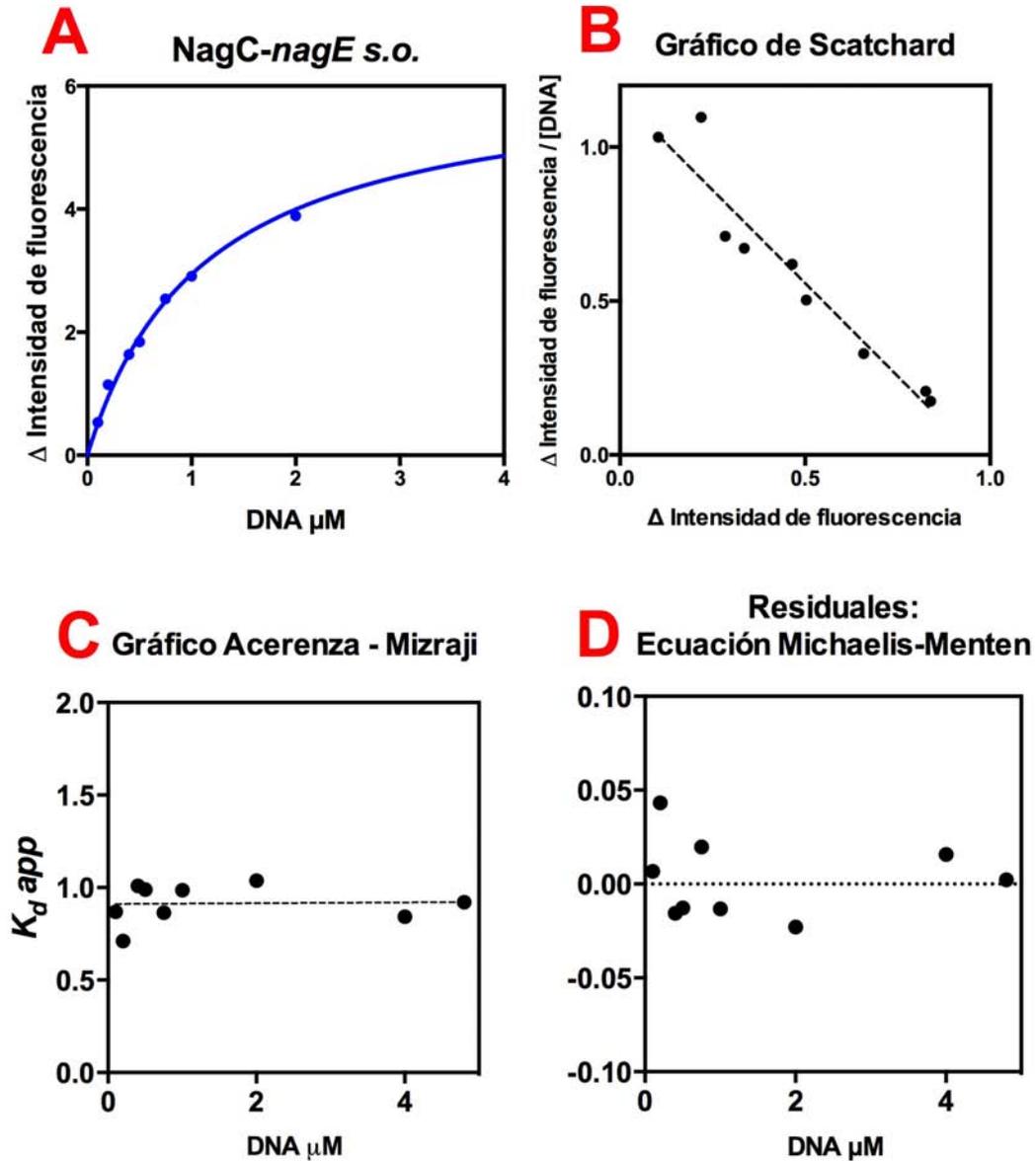


Figura 18. A) Experimentos de unión de NagC en función a la concentración del fragmento de DNA que corresponde a la región operadora *nagE s.o.* La línea continua representa el ajuste de los valores experimentales a la ecuación 1 B) Gráfico de Scatchard. C) Gráfico Acerenza-Mizraji. D) Gráfico de residuales del ajuste a la ecuación 1.

Ecuación	Michaelis-Menten			Hill			MWC					Suma lineal de dos hipérbolas			
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$\bar{Y}_{max}$	$R^2$	$K_{0.5}$ ( $\mu\text{M}$ )	$h$	$R^2$	$L$	$c$	$K_R$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_T$ ( $\mu\text{M}$ )	$R^2$	$K_1$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_2$ ( $\mu\text{M}$ )	$i$	$R^2$
Operador															
<i>nagB</i>	*1.2 ± 0.07	*4.8 ± 0.13	0.9953	3.1 ± 0.05	0.8 ± 0.02	0.9995	--	--	--	--	--	0.03 ± 0.02	1.9 ± 0.13	0.07 ± 0.001	0.9998
<i>nagE</i>	*1.8 ± 0.04	*4.06 ± 0.04	0.9994	1.8 ± 0.01	1.11 ± 0.01	0.9994	6000	0.019 ± 0.01	0.03 ± 0.002	1.8 ± 0.17	0.9996	--	--	--	--
<i>nagE s.o.</i>	0.93 ± 0.06	3.17 ± 0.08	0.9951	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Figura 19. Cuadro comparativo entre las diferentes  $K_{app}$  de NagC por cada región operadora. Los asteriscos en los valores del ajuste a Michaelis-Menten significan que los residuales del ajuste muestran tendencia (datos no mostrados), lo que significa que esta ecuación no representa el comportamiento de los datos experimentales. En color verde se muestran los valores de ajuste para la unión de NagC con el operador *nagB* para las ecuaciones de Michaelis-Menten, Hill y la Ecuación de la suma línea de dos hipérbolas. En color azul turquesa se muestran los valores de ajuste para la unión de NagC con el operador *nagE* para las ecuaciones de Michaelis-Menten, Hill y MWC. Por último en color lila se muestran los valores de ajuste para la unión de NagC con el operador *nagE s.o.* para la ecuación de Michaelis-Menten, en este caso los residuales al ajuste no muestran tendencia (Figura 18).

Ajuste a Hill Estado ligado de NagC	$K_{0.5}$ ( $\mu\text{M}$ )	$h$	$R^2$
<b>NagC-<i>nagE s.o.</i></b>	$0.4 \pm 0.0008$	$2.4 \pm 0.01$	0.9999
<b>NagC</b>	$30 \pm 1.2$	$1.6 \pm 0.11$	0.9946

Figura 20. Cuadro comparativo entre la  $K_{0.5}$  de NagC-*nagE s.o.* (NagC formando un complejo junto con la región operadora *nagE s.o.*) y la  $K_{0.5}$  de NagC por la molécula inductora (GlcNAc6P). En amarillo se muestran los valores de NagC-*nagE s.o.* y en azul los valores para NagC.

### 8.2.2 Titulación de NagC con la molécula inductora

Respecto a la molécula inductora se calculó la afinidad de NagC por esta molécula en dos diferentes condiciones; cuando está saturada de DNA formando el complejo NagC-*nagE* *s.o.* (figura 22) y en la forma libre de DNA (figura 21). Cuando NagC se encuentra formando el complejo junto con el operador *nagE* *s.o.* tiene una  $K_{0.5}$  de 0.4  $\mu\text{M}$  por la GlcNAc6P, mientras que cuando no está unida al DNA su afinidad disminuye, mostrando una  $K_{0.5}$  de 30  $\mu\text{M}$ .

La unión de la GlcNAc6P en ambas condiciones es cooperativa, sin embargo cuando NagC no está unida al DNA la unión tiene un número de Hill de 1.6 (consistente con la cooperatividad de al menos un dímero). Mientras que la unión de GlcNAc6P cuando NagC está formando el complejo NagC-*nagE* *s.o.* tiene un número de Hill de 2.4 (consistente con la cooperatividad de al menos un tetrámero).

Este fenómeno sugiere la existencia de especies oligoméricas, de al menos un dímero cuando NagC es titulada con la molécula inductora y de un tetrámero cuando NagC se encuentra formando el complejo con el DNA.

## Titulación de NagC con GlcNAc6P

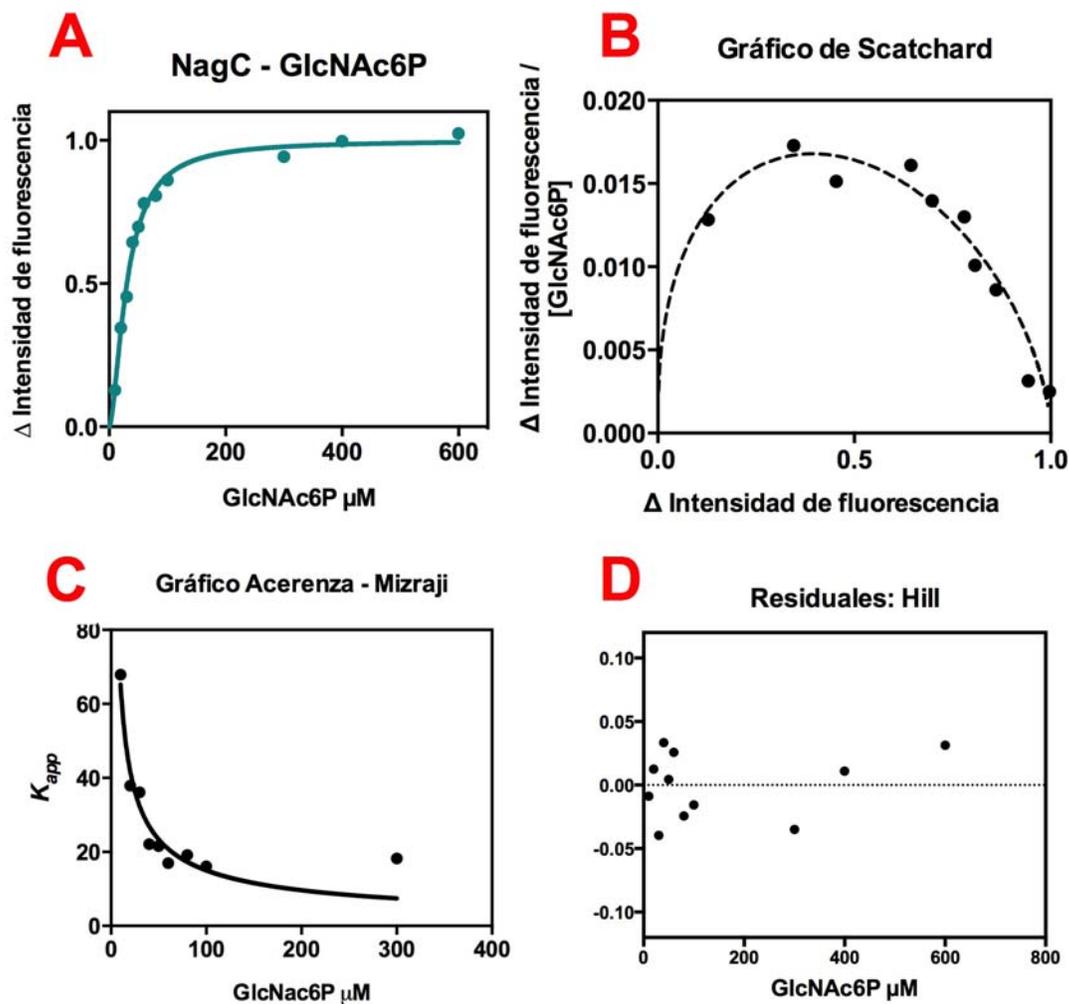


Figura 21. A) Experimentos de unión de NagC en función a la concentración de GlcNAc6P (molécula inductora). La línea continua representa el ajuste de los valores experimentales a la ecuación 2. B) Gráfico de Scatchard. C) Gráfico Acerenza-Mizraji. D) Gráfico de residuales del ajuste a la ecuación 2.

## Titulación de NagC-*nagE* s.o. con GlcNAc6P

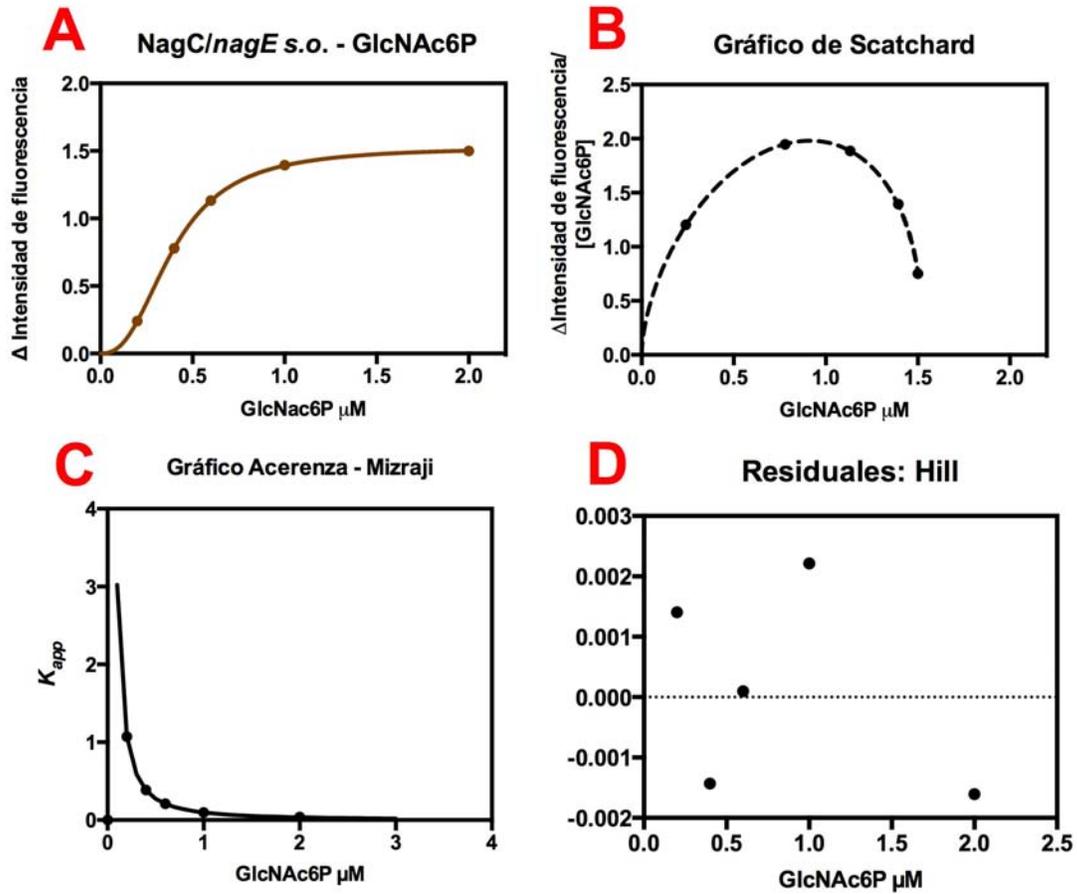


Figura 22. A) Experimentos de unión de NagC formando el complejo con la región operadora *nagE* s.o. en función a la concentración de GlcNAc6P. La línea continua representa el ajuste a la ecuación 2. B) Gráfico de Scatchard. C) Gráfico Acerenza-Mizraji. D) Gráfico de residuales del ajuste a la ecuación 2.

### 8.3 Entrecruzamientos

Realizamos el entrecruzamiento de NagC en diferentes condiciones, encontrando que están presentes dos estados oligoméricos: monómero, dímero y tetrámero. No podemos saber cuantitativamente la proporción de cada especie, sin embargo es claro que aumenta la intensidad de la banda de tetrámero en presencia de DNA.

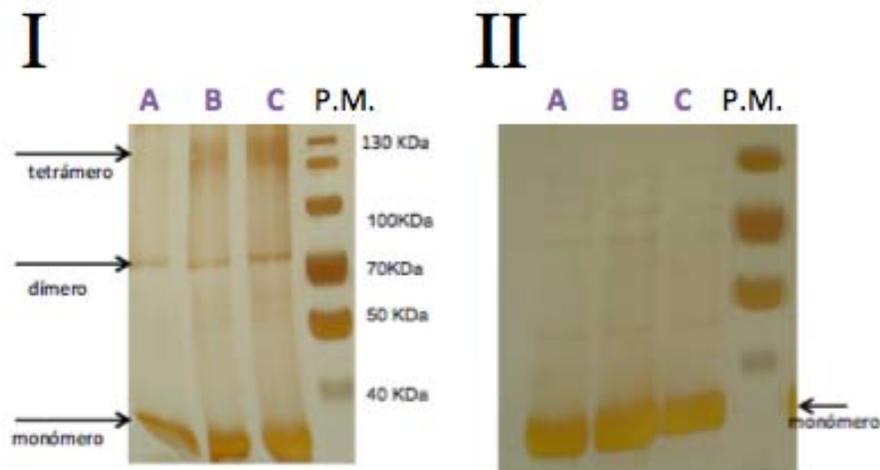


Figura 23. I) SDS-PAGE del entrecruzamiento de NagC con glutaraldehído 2.5% teñido con nitrato de plata. A) Entrecruzamiento de la proteína en ausencia de ligantes. B) Entrecruzamiento de NagC en presencia de la secuencia de la región operadora *nagE s.o.* C) Entrecruzamiento de NagC en presencia de la secuencia de la región operadora *nagB*. El carril P.M corresponde al marcador de peso molecular. II) SDS-PAGE del control del entrecruzamiento, se sustituyó el glutaraldehído con amortiguador NaCl 350 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 35 mM a pH 6.3. Se observa que la cantidad de proteína es uniforme en cada reacción de entrecruzamiento.

## **9.- Discusión**

### **9.1. Sobreexpresión, purificación y estabilidad.**

Los niveles de sobreexpresión de NagC no fueron los esperados a pesar del sistema de sobreexpresión que utilizamos, nosotros pensamos que debido a la poca estabilidad de la proteína.

En cuanto a la purificación las condiciones en las que la proteína resultó tener mayor estabilidad, fue a pH 6.3 con un amortiguador de NaCl 350 mM y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 35 mM. Sin embargo este no fue el único amortiguador que probamos, la proteína se agregaba tanto en Tris-HCl 50 mM pH 7.8 o 6.3; como en HEPES 25 mM, 100 mM glutamato de potasio pH 8.0 o 6.3; con y sin albumina de suero bovino a una concentración de 0.5 mg ml<sup>-1</sup>.

Los diferentes pH que utilizamos se deben a que el punto isoeléctrico calculado de manera teórica para NagC es de 7.1 (tomando en cuenta las seis histidinas extra) por lo tanto buscamos condiciones de pH que estuvieran alejadas del punto isoeléctrico.

Las diferentes condiciones que exploramos nos indican que la estabilidad de la proteína no solo está relacionada con el pH, también con la fuerza iónica del amortiguador, se puede apreciar que en amortiguadores con bajos niveles de NaCl y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> la proteína tampoco es estable.

Por último la purificación se realizó en dos pasos para poder obtener un porcentaje de pureza de alrededor de 90%, para los experimentos que realizamos se necesita tener un alto grado de pureza que nos permita caracterizar con el menor error experimental posible, ya que la contaminación de otra proteína podría alterar nuestras observaciones.

### **9.2 Titulación de NagC con sus diferentes ligantes medidos con fluorescencia.**

La fluorescencia de NagC que observamos depende del ambiente en el que se encuentre el triptófano, esto quiere decir que al observar el apagamiento de la señal podemos suponer dos cosas:

- 1.- Cambio de orientación de triptófano.

2.- Un residuo de la proteína se acerca al triptófano apagando la fluorescencia (quenching).

A pesar de que existen otros residuos aromáticos en NagC, no resulta ser significativa la fluorescencia de los mismos, comparándolos con la alta eficiencia cuántica del triptófano. Esto lo comprobamos excitando a longitudes de onda específicas para tirosina donde no obtuvimos el espectro de mayor intensidad de fluorescencia.

#### 9.2.1 Titulación de NagC con las diferentes regiones operadoras.

- Región operadora *nagB* y *nagE*

En la gráfica de dependencia de la intensidad de fluorescencia respecto a la concentración de ligante podemos observar que los valores no se ajustan a una hipérbola, ajustando a la ecuación 2 observamos cooperatividad negativa, esto junto con los ensayos de entrecruzamiento nos hace pensar que existe una heterogeneidad de especies oligoméricas entre dímero y tetrámero de NagC. Al realizar el ajuste a la ecuación de la suma lineal de dos hipérbolas (ecuación 10) [12], podemos determinar el porcentaje de las dos especies que observamos, sin embargo, no podemos suponer ni inferir a que especie corresponde cada  $K_{app}$  calculada.

La ecuación de la suma lineal de dos hipérbolas, cada unión hiperbólica representa un estado terciario en la Glucosamina-6-fosfato desaminasa (enzima para la cual se propuso esta ecuación). En NagC esta ecuación nos define dos constantes diferentes entre las especies oligoméricas, partiendo de la idea de que al igual que los dos estados terciarios de la desaminasa (relajado y tenso), hay dos estados con diferente afinidad.

En este caso tenemos dos constantes una de alta y otra de baja afinidad, el valor de  $i$  en esta ecuación representa el porcentaje aproximado de especie de alta afinidad con un  $i=0.07$  tendríamos alrededor de 7% de especie de alta afinidad.

El regráfico de Scatchard es sensible para corroborar cooperatividad, cuando la línea del ajuste es cóncavo hacia abajo, nos reafirma la presencia de dos especies con afinidades diferentes.

Los residuales a la ecuación 2 y de la ecuación 10, nos demuestran que no existe una tendencia en los valores, esto valida nuestros valores respecto al ajuste (figura 16).

Cuando titulamos a NagC con *nagE* observamos que las dos constantes que calculamos son consistentes con las dos constantes obtenidas anteriormente con el operador nagB. Sin embargo no es el mismo mecanismo de unión.

Para *nagE* observamos cooperatividad positiva a concentraciones bajas de ligante por lo tanto ajustamos al modelo MWC. Sin embargo como solo a bajas concentraciones de ligante existe cooperatividad positiva no podríamos pensar que el equilibrio de los dos estados oligoméricos estén acoplados a concentraciones más altas de ligante.

El ajuste al modelo de MWC nos permite obtener el valor de  $c$  (que es el cociente de la constante de alta afinidad entre la constante de baja afinidad)

El valor de  $L$  en este modelo es el cociente de la forma de baja afinidad entre la forma de alta afinidad. El valor de  $L$  es de 6000, lo que significa que por cada 6000 moléculas de la proteína de baja afinidad hay 1 molécula de proteína de alta afinidad.

Hasta el momento no podemos determinar de qué depende que cada región operadora se ajuste a un mecanismo diferente de unión, pero podemos suponer que el mecanismo de unión es dependiente de la secuencia de la región. A pesar de la diferencia del mecanismo de unión, las afinidades tendrían que ser similares para poder formarse el “loop” de represión que se ha observado en experimento de “footprint” elaborado por la Dra. Jacqueline Plumbridge. Para reafirmar esta hipótesis de que la secuencia determina el mecanismo de unión, basta observar el comportamiento hiperbólico de la región operadora nagE s.o.

- Región operadora *nagE* s.o.

A diferencia de las regiones operadoras silvestres, nagE s.o. tiene un mecanismo de unión hiperbólico, por lo tanto no es posible distinguir diferentes estados oligoméricos con diferentes constantes de afinidad, por lo tanto las mutaciones en esta secuencia contribuyen a que solo una de las especies oligoméricas tenga afinidad por esta secuencia. La constante de NagC por este operador es el doble de afín respecto a las constantes de baja afinidad de los operadores silvestres, pero 30 veces con menos afinidad que las constantes de alta afinidad.

Se ha visto *in vivo* que esta región reprime de la misma manera sin la necesidad de formar un “loop”, lo que es consistente a que esta secuencia sea la de mayor afinidad.

### **9.2.2 Titulación de NagC con la molécula inductora.**

El objetivo de conocer la afinidad de NagC por su molécula inductora, radica en la importancia fisiológica que este metabolito tiene en la expresión de genes de *E. coli* en presencia de aminoazucares. . Realizamos dos experimentos de unión a GlcNAc6P. El primero consistente en la proteína formando un complejo con el DNA, y el segundo donde la proteína no tiene contacto con el DNA.

La afinidad del complejo NagC-DNA es aproximadamente 40 veces más grande que la afinidad de NagC por la GlcNAc6P. También hemos observado que la molécula inductora provoca que se agregue la proteína (en condiciones donde la proteína es estable), es decir la estabilidad de NagC es inversamente proporcional a la concentración de molécula inductora.

### **9.3 Entrecruzamientos**

Los entrecruzamientos no muestran resultados contundentes respecto al equilibrio que puede o no existir entre los diferentes estados oligoméricos dependiendo del ligante, esto lo atribuimos a que la eficiencia del entrecruzamiento no es la óptima. Sin embargo es posible observar que existe una mezcla de especies oligoméricas en una muestra de NagC con o sin los diferentes ligantes.

## 10.- Conclusiones

- NagC es una proteína que se encuentra en diferentes estados oligoméricos en presencia y ausencia de sus ligantes.
- NagC es una proteína con baja estabilidad en pH cercanos a los fisiológicos, y en amortiguadores con baja fuerza iónica.
- La afinidad que NagC tiene por los dos operadores silvestres *nagB- nagE* es la misma siendo consistente esta información con la formación de un “loop” de represión.
- NagC muestra un incremento en la afinidad de la región operadora *nagE s.o.*

## 11.- Perspectivas

1.- NagC es una proteína con diferentes estados oligoméricos, sin embargo no hemos podido encontrar las condiciones en los experimentos de entrecruzamiento con ligantes que recorran el equilibrio a una sola de sus formas oligoméricas, nosotros pensamos que otros agentes entrecruzantes podrían producir un resultado más claro. Otra observación importante es que debido a que nuestra proteína tiene una cola de histidinas en el C-terminal, esta no es completamente silvestre y no nos permite observar claramente los equilibrios oligoméricos. Por lo tanto es importante contar con NagC sin cola de histidinas, esto no solo nos permitirá apreciar los diferentes estados oligoméricos, también facilitará el estudio estructural de la proteína, ya que como lo mencionamos con anterioridad no se encuentra una estructura cristalográfica reportada.

2.- Como se ha visto en el laboratorio con la enzima codificada por el gen *nagB*, la alostería y la cooperatividad son dos fenómenos dissociables, por lo tanto creemos que nanoencapsular NagC no solo le dará estabilidad a la proteína, también nos permitirá saber si el cambio conformacional que provoca la unión de la molécula inductora es un cambio únicamente conformacional o incluye también un cambio de estado de oligomerización.

3.- Cuando realizamos las titulaciones con el inductor la proteína tiende a agregarse, formando agregados insolubles que se observan a simple vista, por lo tanto pensamos que esta agregación es un mecanismo de la proteína cuando se encuentra en presencia del inductor. Para probarlo proponemos seguir una cinética de desnaturalización por medio de dicroísmo circular en el UV lejano en conjunto con la dispersión de luz a 90°, y comparar estos datos con el desplegamiento de la proteína por otros métodos como la desnaturalización por calor.

4.- Realizar las titulaciones con la secuencia completa de los operadores y la región intergénica para conocer la importancia que tiene la topología del DNA en la afinidad de la proteína por estas secuencias, así como apreciar con mayor claridad la formación del “loop” de represión; esto posiblemente con una estrategia de FRET con fluoroforos distintos en las puntas de la secuencia del operador completo. Se ha propuesto anteriormente por medio de estudios *in silico* que aunque son sólo tres aminoácidos de la hélice de reconocimiento que interaccionan con tres bases del DNA, el resto de la secuencia parece que es importante para dar especificidad. Aunque también hemos visto que cambia el mecanismo de acoplamiento de la unión.

5.- Cristalizar NagC y resolver su estructura es importante, ya que en la familia de estos represores hay poca información estructural.

## 12.-Bibliografía

- [1] Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
- [2] Jacob, F., & Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of molecular biology*, 3(3), 318-356.
- [3] Swint-Kruse, L., & Matthews, K. S. (2009). Allostery in the LacI/GalR family: variations on a theme. *Current opinion in microbiology*, 12(2), 129-137.
- [4] Monod, J., Changeux, J. P., & Jacob, F. (1963). Allosteric proteins and cellular control systems. *Journal of molecular biology*, 6(4), 306-329.
- [5] Peracchi, A., & Mozzarelli, A. (2011). Exploring and exploiting allostery: Models, evolution, and drug targeting. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1814(8), 922-933.
- [6] Bustos-Jaimes L, D.A.-A.L., Caccagno ML., Allostery and co-operativity in protein function. *Advances in protein physical chemistry*, 2008. 37(661): p. 219-248.
- [7] Cornish-Bowden, A., *Fundamentals of enzyme kinetics*. Vol. 3. 1995: Portland Press London.
- [8] Adair, G.S., The osmotic pressure of haemoglobin in the absence of salts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 1925. 109(750): p. 292-300.
- [9] Monod, J., J. Wyman, and J.-P. Changeux, On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *Journal of molecular biology*, 1965. 12: p. 88
- [10] Muirhead, H. and M. Perutz, Structure Of Hemoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis of Reduced Human Haemoglobin at 5.5 Å Resolution. 1963
- [11] Vázquez-Núñez, R.J., Los cambios conformacionales terciarios de la Glucosamina-6-fofato desaminasa de *Escherichia coli*, determinan al componente cuaternario de la transición alostérica., *Licenciatura en Investigación Biomédica Básica* 2013, Universidad Nacional Autónoma de México.
- [12] Segel, I. H. (1975). *Enzyme kinetics* (Vol. 360). Wiley, New York.
- [13] Zonszein, S., Álvarez-Añorve, L. I., Vázquez-Núñez, R. J., & Caccagno, M. L. (2014). The Tertiary Origin of the Allosteric Activation of *E. coli* Glucosamine-6-

Phosphate Deaminase Studied by Sol-Gel Nanoencapsulation of Its T Conformer. *PLoS one*, 9(5), e96536.

[14] El Qaidi, S., & Plumbridge, J. (2008). Switching control of expression of ptsG from the Mlc regulon to the NagC regulon. *Journal of bacteriology*, 190(13), 4677-4686.

[15] Álvarez-Añorve, L. I., Calcagno, M. L., & Plumbridge, J. (2005). Why does *Escherichia coli* grow more slowly on glucosamine than on N-acetylglucosamine? Effects of enzyme levels and allosteric activation of GlcN6P deaminase (NagB) on growth rates. *Journal of bacteriology*, 187(9), 2974-2982.

[16] Bréchemier-Baey, D., Domínguez-Ramírez, L., & Plumbridge, J. (2012). The linker sequence, joining the DNA-binding domain of the homologous transcription factors, Mlc and NagC, to the rest of the protein, determines the specificity of their DNA target recognition in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 85(5), 1007-1019.

[17] Plumbridge, J., & Kolb, A. (1993). DNA loop formation between Nag repressor molecules bound to its two operator sites is necessary for repression of the nag regulon of *Escherichia coli* in vivo. *Molecular microbiology*, 10(5), 973-981.

[18] Cournac, A., & Plumbridge, J. (2013). DNA looping in prokaryotes: experimental and theoretical approaches. *Journal of bacteriology*, 195(6), 1109-1119.

[19] Gaugué, I., Bréchemier-Baey, D., & Plumbridge, J. DNase I Footprinting to Identify Protein Binding Sites.

[20] Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2009: Springer.

[21] Smith, P., et al., Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 1985. 150(1): p. 76-85

[22] Blum, H., Beier, H., & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *electrophoresis*, 8(2), 93-99.

[23] Wilson, C. J., Zhan, H., Swint-Kruse, L., & Matthews, K. S. (2007). The lactose repressor system: paradigms for regulation, allosteric behavior and protein folding. *Cellular and molecular life sciences*, 64(1), 3-16.

[24] Plumbridge, J., & Vimr, E. (1999). Convergent pathways for utilization of the amino sugars N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine, and N-acetylneuraminic acid by *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 181(1), 47-54.

- [25] Fenton, A. W. (2008). Allostery: an illustrated definition for the 'second secret of life'. *Trends in biochemical sciences*, 33(9), 420-425.
- [26] Plumbridge, J., & Kolb, A. (1991). CAP and Nag repressor binding to the regulatory regions of the nagE-B and manX genes of *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*, 217(4), 661-679.
- [27] Lewis, M. (2013). Allostery and the lac Operon. *Journal of molecular biology*, 425(13), 2309-2316.